

**CESAR AUGUSTO BARROS DUARTE**

**DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO E SUBTIPO DO VÍRUS DA HEPATITE C  
ATRAVÉS DE MICROARRANJO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de doutor.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

**CURITIBA**

**2009**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Roberto e Donata, que sempre me incentivaram em tudo.

À minha esposa Andrea e aos meus filhos Daniel e Sofia pela compreensão e apoio a mim oferecidos.

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger, pela oportunidade, confiança, apoio e dedicação para tornar possível este trabalho.

À Dra. Sueli Nakatani pelo fornecimento das amostras, por compartilhar experiência, conhecimentos e por seu interesse na realização deste trabalho.

Ao colega Leonardo Foti pela colaboração na realização neste trabalho.

À Dra. Daniela Parada Pavoni pela revisão do trabalho e sugestões para melhorá-lo.

A todos os diretores do Instituto Carlos Chagas (ICC), por me disponibilizar um ambiente tão estimulante para o aprendizado e trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná pelo apoio e oportunidade.

A todos os colegas e funcionários do ICC, pela colaboração e amizade.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hepatite não-A, não-B.....	1
1.2 O Vírus da Hepatite C.....	1
1.2.1 A origem do vírus da hepatite C .....	3
1.2.2 A diversidade nucleotídica do HCV.....	4
1.2.3 Genótipos, subtipos e <i>quasispecies</i> .....	6
1.2.4 Ciclo celular e cinética viral.....	6
1.3. Manifestações clínicas.....	7
1.4. Epidemiologia.....	8
1.5. Diagnóstico laboratorial.....	12
1.5.1 Ensaios sorológicos.....	12
1.5.2 Detecção do RNA do HCV.....	14
1.5.2.1 Detecção qualitativa do RNA do HCV.....	14
1.5.2.2 Detecção quantitativa do RNA do HCV.....	15
1.5.3 Testes de determinação de genótipo e subtipo do HCV.....	16

1.5.3.1 Determinação do genótipo através de método imunológico.....	18
1.5.3.2 Seqüenciamento de região E1 & NS5b análise filogenética....	18
1.5.3.3 Hibridização reversa (Versant HCV genotype 1.0).....	19
1.5.3.4 Seqüenciamento da região 5'UTR.....	20
1.5.3.5 Polimorfismo de extensão de fragmento de restrição (RFLP).20	
1.5.3.6 RT-PCR em Tempo-real.....	21
1.5.3.7 Espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	23
1.5.3.8 Teste baseado em sondas e sítios de clivagem específicos.....	24
1.5.3.9 Microarranjo Líquido (Luminex Xmap).....	25
 2. OBJETIVOS.....	 31
3. JUSTIFICATIVAS.....	32
4. MATERIAIS e MÉTODOS.....	34
4.1. Amostras de plasma.....	34
4.2 Extração do RNA.....	34
4.3 Desenho dos oligonucleotídeos.....	35
4.4 Reação de transcrição reversa e de PCR.....	39
4.5 Ligação das sondas às microesferas de poliestireno.....	40
4.6 Confirmação da ligação das sondas às microesferas.....	41
4.7 Hibridização dos produtos de PCR com as sondas ligadas às microesferas.....	42
4.8. Leitura da reação de hibridização e obtenção de dados.....	43
4.9. Análise estatística.....	44

<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
5.1. Eficiência da PCR.....	45
5.2. Confirmação da ligação das sondas às microesferas.....	47
5.3. Sensibilidade do ensaio na determinação do genótipo e subtipo do HCV.....	48
5.3.1 Sensibilidade em relação ao genótipo 3; subtipo 3a.....	49
5.3.2. Sensibilidade em relação ao genótipo 2; subtipos 2a, 2b e 2c.....	51
5.3.3. Sensibilidade em relação ao genótipo 1; subtipo 1a e 1b.....	54
5.4. Especificidade do ensaio de microarranjo líquido.....	60
5.5. Avaliação de reprodutibilidade do teste.....	61
5.6. Avaliação da concordância em relação ao método de seqüenciamento análise filogenética da região NS5b.....	62
5.7. Avaliação da concordância em relação ao método comercial Versant HCV genotype 1.0.....	64
5.8. Avaliação da concordância em relação ao método RT-PCR em Tempo-real <i>in house</i> . ....	65
 6.DISSCUSSÃO.....	 67
7.CONCLUSÕES .....	76
REFERÊNCIAS.....	77

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> Genoma do vírus da hepatiteC.....	2
<b>FIGURA 2-</b> Variabilidade nucleotídica do HCV correlacionada à região genômica.....	5
<b>FIGURA 3-</b> Prevalência dos diferentes genótipos no Brasil.....	10
<b>FIGURA 4-</b> Correlação entre distribuição geográfica e grupos de risco.....	11
<b>FIGURA 5-</b> Ilustração do esquema do método de PCR em tempo real.....	23
<b>FIGURA 6-</b> Representação esquemática do sistema Luminex® x MAP .....	25
<b>FIGURA 7-</b> Imagem à microscopia de varredura das microesferas.....	26
<b>FIGURA 8-</b> Fotografia de gel de eletroforese.....	46
<b>FIGURA 9-</b> MFI da hibridização de oligonucleotídeos complementares e <i>background</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> Distribuição geográfica do HCV.....	9
<b>TABELA 2-</b> Métodos para determinação do genótipo-subtipo do HCV.....	17
<b>TABELA 3-</b> <i>Primers</i> para amplificação das regiões 5'UTR e NS5b.....	36
<b>TABELA 4-</b> Sondas de captura da região 5'UTR.....	37
<b>TABELA 5-</b> Sondas de captura da região NS5b.....	38
<b>TABELA 6-</b> Resultados da Sensibilidade.....	49
<b>TABELA 7-</b> Amostras 3a e valores de net MFI das sondas para região 5'UTR.....	50
<b>TABELA 8-</b> Amostras 3a e valores de net MFI das sondas para região NS5b.....	51
<b>TABELA 9-</b> Amostras gen. 2 e valores de net MFI das sondas para região 5'UTR.....	52
<b>TABELA 10-</b> Amostras gen. 2 e valores de net MFI das sondas para região NS5b.....	53
<b>TABELA 11-</b> Amostras gen. 1 e valores de net MFI das sondas para região 5'UTR.....	55

<b>TABELA 12-</b> Amostras gen.1 e valores de net MFI das sondas para região NS5b.....	56
<b>TABELA 13-</b> Amostras 1a e valores de net MFI das sondas para região 5'UTR.....	57
<b>TABELA 14-</b> Amostras 1a e valores de net MFI das sondas para região NS5b.....	58
<b>TABELA 15-</b> Amostras 1b e valores de net MFI das sondas para região 5'UTR.....	59
<b>TABELA 16-</b> Amostras 1b e valores de net MFli das sondas para região NS5b.....	60
<b>TABELA 17-</b> Coeficiente de variação do net MFI (intra-ensaio).....	61
<b>TABELA 18-</b> Coeficiente de variação do net MFI (inter-ensaio).....	62



## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ct:** *threshold cycle*

**CV:** coeficiente de variação

**Delta Rn:** variação de fluorescência normalizada

**DNA:** *deoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

**cDNA:** DNA complementar

**dNTPs:** desoxirribonucleotídeos trifosfatados

**DO:** densidade óptica

**EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético

**EDC:** 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida HCL

**ELISA:** *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imuno-enzimático)

**FAM:** 6-carboxifluoresceína

**FRET:** *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (transferência de energia por ressonância de fluorescência)

**HIV:** *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

**HAV:** vírus da hepatite A

**HBV:** vírus da hepatite B

**HCV:** (vírus da hepatite C)

**M:** molar

**MES:** *Morpholineethanesulfonic acid*

**MALDI-TOF:** *matrix- assisted laser desorption ionization-time of flight*

**MFI:** *median fluorescence intensity*

**μl:** microlitro

**ml:** mililitro

**μM:** micromolar

**mM:** milimolar

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PCR:** *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

**pb:** pares de base

**RNA:** *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

**RT-PCR:** *reverse transcription - polymerase chain reaction*

**TAMRA:** 6-tetrametilcarboxirrodamina

**T<sub>m</sub>:** *melting temperature*

**TMA:** *transcription mediated amplification* (amplificação mediada por transcrição)

**TMAC:** tetramethylammonium chloride

## RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite C acomete cerca de 3% da população mundial e a prevalência no Brasil está próxima deste valor. Seu impacto social é enorme, tanto na morbidade e mortalidade, quanto nos custos que seu tratamento demanda. O tratamento baseado no uso de interferon é efetivo em uma fração dos casos. Uma vez que a determinação do genótipo do HCV é fundamental para a condução do tratamento, métodos diagnósticos com esta finalidade fazem-se necessários.

Este trabalho publica pela primeira vez na literatura, ao menos pelo conhecimento do autor, a utilização da metodologia de microarranjo líquido na determinação do genótipo e subtipo do HCV. Na avaliação de oitenta amostras positivas para a presença do HCV, o ensaio foi capaz de determinar o genótipo em setenta e seis (76/80, sensibilidade de 95%). A avaliação de sua concordância com outros métodos: seqüenciamento da região NS5b , Versant HCV genotype 1.0 e RT-PCR “in house”, foi realizada. A concordância em relação à determinação do genótipo foi total em relação aos demais métodos, sendo o de seqüenciamento o padrão ouro. A determinação do subtipo foi possível em cinquenta e duas amostras com genótipos determinados (52/76, 68%). Uma vez que para o tratamento da hepatite somente a determinação do genótipo, e não do subtipo é necessária, conclui-se que o teste baseado em microarranjo pode ser utilizado para esta finalidade; sendo sensível, específico, de alto rendimento e de relação custo benefício favorável.

## ABSTRACT

Worldwide 3% of the population is infected by hepatitis C virus, and a number next to this is believed to occur in Brazil as well. Its social impact is huge, when morbidity and mortality are considered, also treatment associated costs. Interferon based treatment is favorable in a fraction of cases. Since it was established the importance of HCV genotyping regarding treatment, diagnostics methods are in high demand. The present work is the first to publish on liquid microarray utilization for HCV genotyping, at least to the author knowledge. Eighty positive samples for HCV presence evaluated showed seventy six to have their genotypes determined by the microarray test (76/80, sensitivity of 95%). Agreement evaluation with other methods: NS5b sequencing, Versant HCV genotype 1.0 and RT-PCR *“in house”* was performed. When genotyping is considered, total agreement was found compared to the other methods; sequencing being considered the “gold standard” . Subtyping determination was possible in fifty two of those genotyped (52/76, 68%). Once considered that only genotyping matters to treatment decision, and not subtyping, it is concluded that microarray can be utilized to this goal; find to be sensitive, specific, of high throughput and cost effective.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Hepatite não-A, não-B**

Na década de 70 foi detectada a ocorrência de hepatite (inflamação hepática) pós-transfusional em cerca de 10% dos pacientes após receberem algum hemocomponente. Sendo que nestes pacientes não se detectava marcadores virais para as já conhecidas hepatites A e B, sugeriu-se a existência de um terceiro vírus para explicar estes casos, mas este parecia escapar aos métodos de investigação empregados até então (FEINSTONE *et al.*, 1975). Somente em 1989, Choo *et al.* obtiveram um clone de cDNA a partir de um paciente com hepatite não-A e não-B. Este patógeno passou a ser conhecido como vírus da hepatite C (HCV). A partir desta descoberta, não levou muito tempo para que fossem desenvolvidos os primeiros testes capazes de detectar anticorpos contra o HCV (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Com o subsequente implante destes testes em bancos de sangue, os casos da até então denominada hepatite não-A, não-B diminuíram acentuadamente (DONAHUE *et al.*, 1992).

### **1.2. O Vírus da Hepatite C**

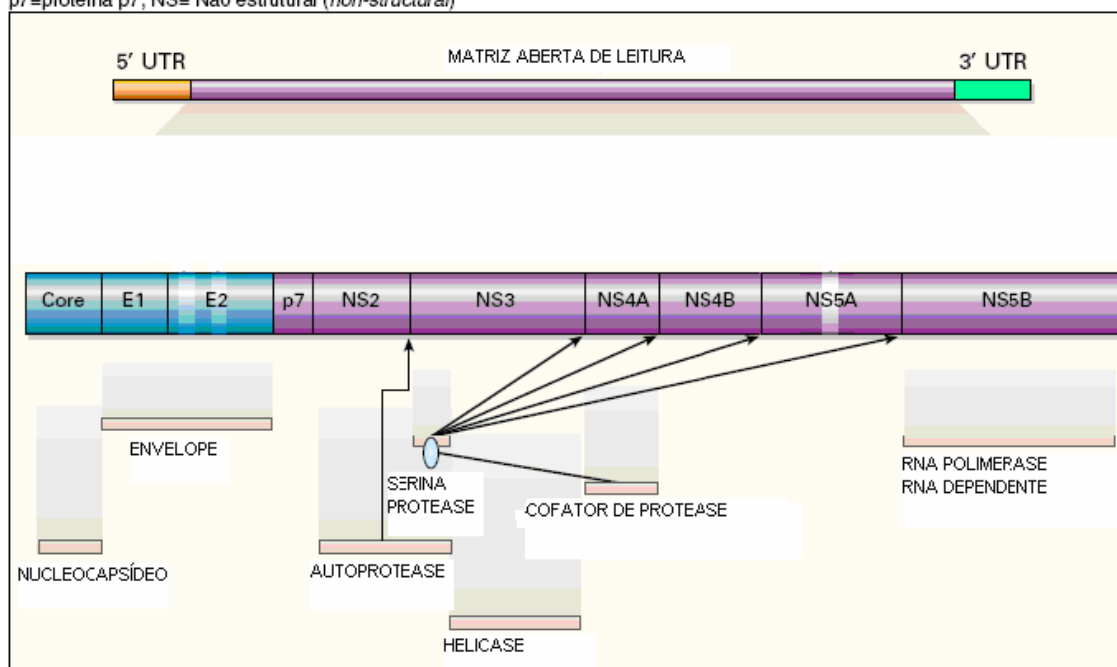
Apesar de enorme esforço desde sua descoberta, o cultivo do vírus só tornou-se possível recentemente, e apenas para um genoma único (JFH1), obtido de um paciente com hepatite aguda fulminante no Japão (KATO *et al.*, 2001). A maior

parte do conhecimento sobre o HCV é proveniente de sistemas replicativos *in vitro* (*replicons*), capazes de proporcionar a replicação genômica, sub-genômica e expressão protéica (LOHMANN *et al.*, 1999; RICE *et al.*, 2002; BARTENSCHLAGE *et al.*, 2003).

O HCV pertence à Família Flaviviridae, apresentando uma única fita de RNA com polaridade positiva. Seu genoma possui cerca de 9600 nucleotídeos com duas regiões não-codificadoras em suas extremidades, sendo sua porção codificante geradora, em matriz aberta de leitura, de uma poliproteína de 3010 a 3033 aminoácidos (dependendo do genótipo), que sob ação autoproteolítica e proteolítica da célula hospedeira (hepatócito), origina proteínas estruturais (C, E1, E2) e não-estruturais (NS-2, p7, NS-3, NS-4A, NS-4B, NS-5A, NS-5B) (LOHMANN *et al.*, 1996; PENIN *et al.*, 2004; DREXLER *et al.*, 2009) (FIGURA 1).

#### FIGURA 1. GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE C

5'UTR (*untranslated region*)- região não-codificadora, região mais conservada do genoma; E= envelope; p7=proteína p7; NS= Não estrutural (*non-structural*)



Fonte: Lauer G. M., Walker B. D, 2001. (modificado).

A análise filogenética de amostras do HCV, seja da sequência parcial ou total, isoladas em várias regiões do mundo, levou a identificação de diferentes genótipos do HCV, incluindo seis tipos principais, enumerados de 1 a 6, e um grande número de subgrupos dentro destes genótipos, chamados “subclados” ou “subtipos” e identificados por letras minúsculas (1a, 1b, etc.). Os tipos diferem de 31% a 34% em suas sequências de nucleotídeos e aproximadamente 30% em suas sequências de aminoácidos, enquanto os subtipos diferem em 20% a 23% em suas sequências de nucleotídeos, com importantes diferenças conforme a região genômica (SIMMONDS, 1995; ROBERTSON *et al.*, 1998).

#### **1.2.1. A origem do vírus da hepatite C**

É difícil estimar o tempo que o HCV tem estado presente na população humana. A diversidade de variantes dentro dos genótipos 1, 2 e 4 na África sub-saariana e dos genótipos 3 e 6 no sudeste asiático sugerem que o HCV tem sido endêmico nestas populações por muito mais tempo do que nos países ocidentais (SIMMONDS, 2004). Uma vez que o processo evolucionário da divergência de sequências que levou à diversidade de subtipos é predominantemente neutro, é possível calcular os tempos de separação dos subtipos e talvez mesmo os tempos de separação dos seis principais clados (genótipos) através do conhecimento das taxas de modificação das sequências (OKAMOTO *et al.*, 1992). A extrapolação destas taxas para datação, considerando os 20 a 30% de divergência de sequências que é observado entre os subtipos e genótipos respectivamente, produzem um tempo relativamente recente de origem, difícil de conciliar com a epidemiologia do HCV e sua distribuição global.

Mesmo utilizando métodos complexos para a correção de múltiplas substituições e considerando taxas de variação entre os sítios, a atual diversidade entre os genótipos prevê uma origem não inferior a 1000 anos. Isto parece muito recente para um vírus tão difusamente distribuído que infecta frequentemente populações relativamente isoladas na África equatorial e sudeste asiático (PATHIRANA *et al.*, 1997).

### 1.2.2. A diversidade nucleotídica do HCV

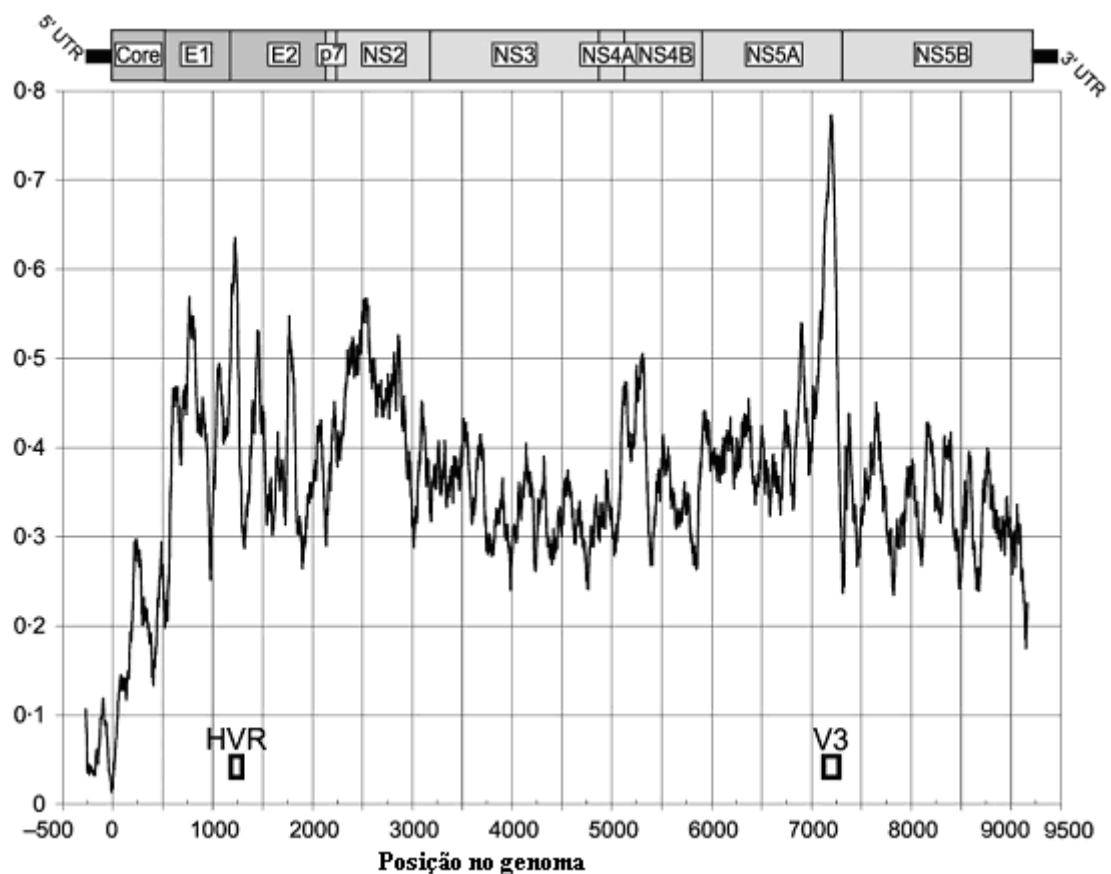
Como membro da família flaviviridae, a RNA polimerase viral do HCV não possui a função de corrigir erro ocorridos no processo de transcrição. Isto acarreta uma taxa de erro entre 1 em 10.000 e 1 em 100.000 pares de bases copiadas. Associada a uma taxa de *turnover* de  $10^{12}$  vírions por dia, isto explica parte da altíssima variabilidade nucleotídica do HCV (FIGURA 2). Esta alta taxa de erro reflete-se na geração de uma miríade de vírus heterogêneos, porém filogeneticamente relacionados, dentro de um mesmo hospedeiro denominados de *quasispecies*. A ocorrência de *quasispecies* no HCV pode ser melhor ilustrada pela análise de um segmento curto, mas acentuadamente polimórfico na região codificadora do envelope viral designada região hipervariável 1 (HVR 1) (TIMM *et al.*, 2007). Evidência de evolução Darwiniana e neutra podem ser encontradas nas sequências do HCV. Um possível exemplo de mudança adaptativa do HCV é a rápida evolução da região hipervariável da glicoproteína do envelope E2, a fim de prevenir seu reconhecimento pelos anticorpos produzidos durante a infecção. Em contraste, a variação nucleotídica neutra é responsável pela maior parte da



diversidade encontrada em populações de HCV geograficamente e epidemiologicamente separadas.

Na verdade, o HCV acumula maior número de variações nucleotídicas como resultado de mutações neutras do que de mudanças adaptativas. A diversidade encontrada acaba sendo o resultado da combinação de: velocidade de mutação elevada, grande tamanho da população e pressão seletiva encontrada pelo HCV.

**FIGURA 2.** VARIABILIDADE NUCLEOTÍDICA DO HCV CORRELACIONADA À REGIÃO GENÔMICA.



FONTE: SIMMONDS,2004 (modificado).

### **1.2.3. Genótipos, subtipos e *quasispecies*.**

A comparação de sequências obtidas de indivíduos infectados provenientes de diferentes grupos de risco e diferentes localizações geográficas têm revelado a existência de ao menos seis principais grupos genéticos. Considerando todo o genoma estes grupos (genótipos) diferem, em média, em cerca de 30% dos sítios nucleotídicos, com maior variabilidade concentrada nas regiões E1 e E2, enquanto as regiões do gene *core* e região NS3 são mais conservadas. A região mais conservada entre os genótipos é a região 5'UTR, onde uma sequência específica e consequente estrutura secundária são necessárias para as funções de replicação e tradução. Cada um dos maiores seis genótipos contém uma série de subtipos similares que tipicamente diferem entre si em cerca de 20% de suas sequências nucleotídicas.

A combinação de uma replicação viral, com a produção de cópias realizada pela RNA polimerase (NS5B), altamente propensa ao erro e população replicante de número imenso resultam em uma população altamente diversa geneticamente. Estas variantes (*quasispecies*) contêm mutantes que diferem em cada posição nucleotídica e em cada combinação de diferenças pareadas em relação à população consenso.

### **1.2.4. Ciclo celular e cinética viral**

Após a infecção, o HCV se difunde rapidamente nos hepatócitos. Ainda que

não determinado ao certo o mecanismo da entrada do HCV nos mesmos, parece que a interação entre E2 e a alça extracelular de CD81, uma tetraspanina, tem papel importante. Há evidências também da presença do vírus em linfócitos, células do epitélio intestinal e sistema nervoso central (FLINT *et al.*, 2001).

Após a liberação do RNA viral no interior da célula, este se destinará a três funções: a) tradução nas proteínas estruturais e não-estruturais b) replicação sob a ação de uma RNA polimerase - RNA dependente (NS-5B) e c) empacotamento na partícula final do vírus (RICE *et al.*, 2005).

Muito do que se sabe sobre a cinética viral do HCV veio de estudos com a infecção experimental de chimpanzés e de pacientes com hepatite C que receberam transplante hepático. A aplicação de modelos matemáticos nestas situações e em relação à variação da viremia em pacientes que receberam interferon- $\alpha$  forneceu informações importantes: a) pacientes com infecção crônica tipicamente têm carga viral de  $10^3$  a  $10^7$  genomas por mililitro de plasma, b) cerca de  $10^{12}$  vírus são produzidos por dia, com uma meia-vida estimada em 3 horas e c) a carga viral, uma vez atingindo determinado patamar, tende a permanecer constante por anos, o que denota produção e destruição do vírus equilibradas (NEUMANN *et al.*, 1998).

### **1.3. Manifestações clínicas**

O HCV causa hepatite aguda e crônica, sendo os sintomas mais comuns na infecção aguda a náusea, mal-estar e icterícia. No entanto, na grande maioria das vezes, a infecção aguda é assintomática. Em cerca de 70% dos casos a infecção se torna crônica e resulta em cirrose hepática após 20 a 30 anos em 20% dos casos. A

infecção pelo HCV também causa, ainda por mecanismos indeterminados, carcinoma hepatocelular em 4% dos pacientes com cirrose, anualmente (IKEDA, *et al.*, 1998).

Em países desenvolvidos, a cirrose hepática causada pelo vírus da hepatite C é responsável pela maior parte dos transplantes hepáticos em adultos.

A transmissão do HCV ocorre pelo contato com sangue contaminado, sendo considerados em risco os seguintes grupos: pacientes que receberam transfusão sanguínea antes da década de 90, usuários de drogas injetáveis, indivíduos promíscuos sexualmente e aqueles que se utilizam de práticas de tatuagem e colocação de *piercing* com material contaminado. A transmissão do HCV por relação sexual é infreqüente assim como a transmissão vertical a recém-natos (ALTER *et al.*, 1992; OHTO *et al.*, 1994).

Além das doenças hepáticas, ocorrem, ainda, manifestações extrahepáticas, sendo as principais de ordem auto-imune e linfoproliferativa, cuja explicação pode estar relacionada com a possibilidade de replicação do HCV em linfócitos (Zignego *et al.*, 1999).

O tratamento da hepatite C tem na combinação do Interferon- $\alpha$  e ribavirina sua melhor chance de cura (20-50%). O tratamento tem um alto custo, necessita de monitoramento laboratorial e efeitos colaterais são freqüentes.

#### **1.4 Epidemiologia**

Estima-se que 170 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV em todo mundo com cerca de 3 a 4 milhões de novas infecções a cada ano, sendo que,

destas, 70% desenvolverão hepatite crônica (OMS, 1999).

A hepatite C está presente em todos os continentes em prevalências e genótipos variáveis (TABELA 1).

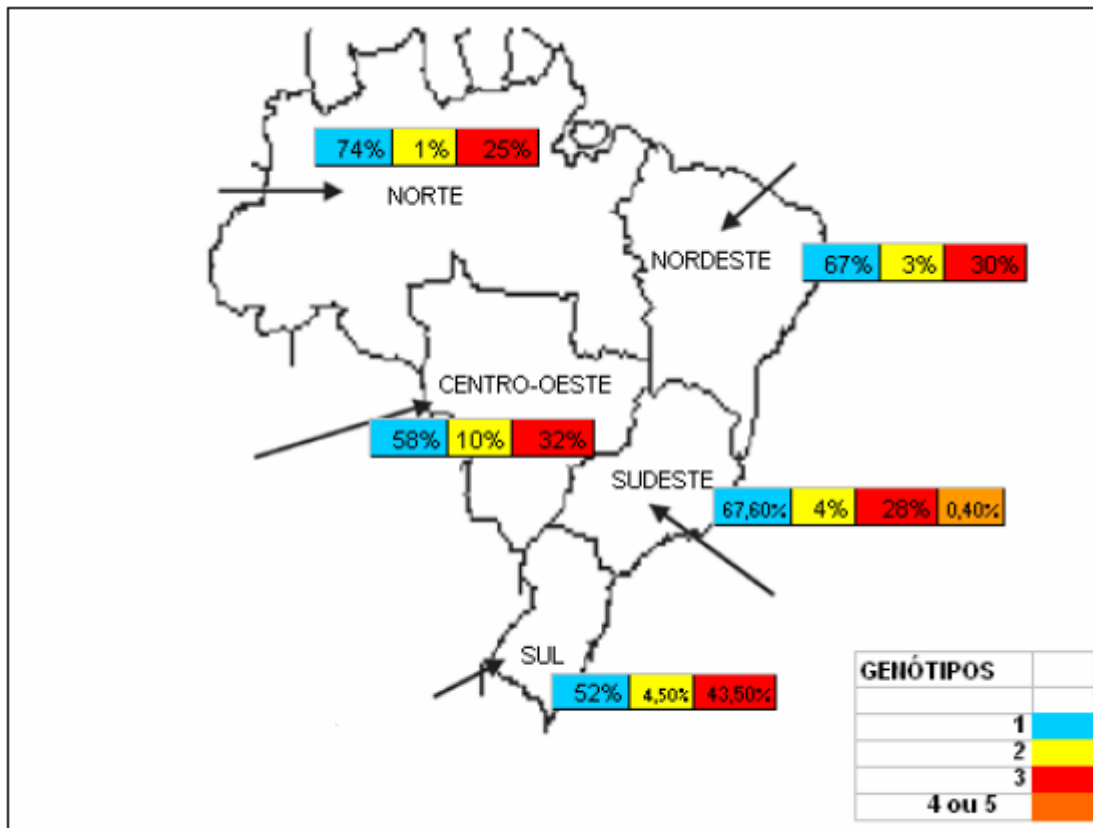
**TABELA 1.** DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO HCV.

<b>Região</b>	<b>População Total (Milhões)</b>	<b>Genótipos (1-6)</b>	<b>Prevalência (%)</b>	<b>População Infectada (Milhões)</b>
África	602	1,4,5	5,3	31,9
Américas	785	1,2,3	1,7	13,1
Mediterrâneo	466	1,2,3	4,6	21,3
Europa	858	1,2,3,5	1,03	8,9
Sudeste Asiático	1 500	3,6	2,15	32,3
Pacífico Oeste	1 600	1,2,3	3,9	62,2
<b>Total</b>	<b>5 811</b>		<b>3,1</b>	<b>169,7</b>

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 1999. (modificado).

No Brasil estima-se que a prevalência varie de 0,8% a 3,4% nas diferentes regiões do país (CARRILHO & CORRÊA, 1998), encontrando-se os genótipos 1, 2 e 3 e raramente os genótipos 4 e 5 (FIGURA 3).

**FIGURA 3. PREVALÊNCIA DOS DIFERENTES GENÓTIPOS NO BRASIL.**

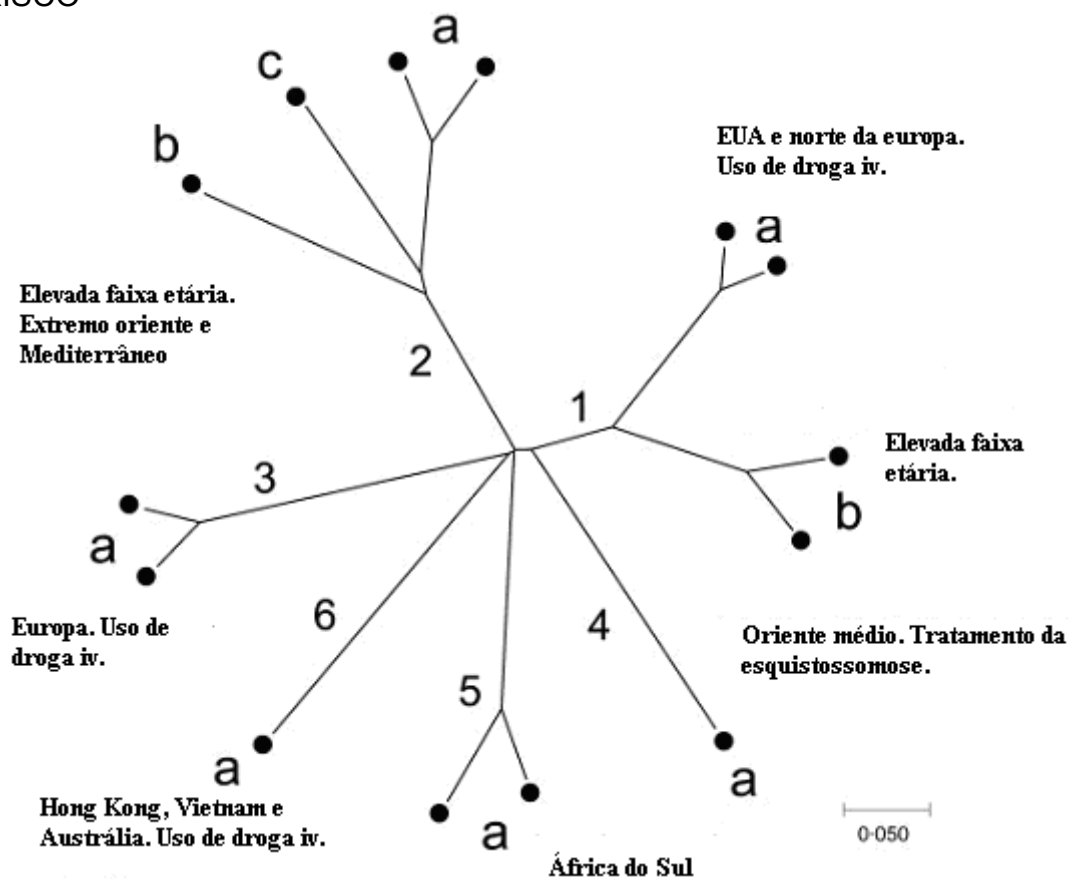


Fonte: Campiotto *et al.*, 2005. (modificado).

A variação na distribuição dos diferentes genótipos e subtipos do HCV se dá não somente nas diferentes regiões geográficas, mas também em diferentes grupos de risco. O subtipo 1a acomete principalmente indivíduos usuários de drogas injetáveis, enquanto o subtipo 1b predomina em grupos de faixa etária elevada. O genótipo 2 é encontrado frequentemente na região do mediterrâneo também nos grupos de idade mais elevada, enquanto o genótipo 3 é amplamente distribuído na europa frequentemente entre usuários de drogas injetáveis.

O genótipo 4 é muito freqüente no oriente médio, particularmente devido a sua disseminação pelo compartilhamento de agulhas no passado quando ocorreu o tratamento em larga escala para a esquistossomose. O genótipo 6 é comumente encontrado em Hong Kong e Vietnã principalmente em usuários de drogas injetáveis, estando o genótipo 5 geralmente restrito a África do Sul (FIGURA 4).

**FIGURA 4.** CORRELAÇÃO ENTRE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E GRUPOS DE RISCO



FONTE: SIMMONDS, 2004 (modificado).

## **1.5. Diagnóstico Laboratorial**

A identificação do HCV, por métodos moleculares, permitiu o desenvolvimento de métodos de diagnóstico imunoenzimáticos (CHOO *et al.*, 1989).

Estes métodos possibilitaram a implementação de rotinas sorológicas em bancos de sangue na década de 90, quando se iniciou a detecção de indivíduos soropositivos que, conseqüentemente, foram rejeitados como doadores. Isto causou a mudança das características epidemiológicas da infecção pelo HCV, passando de sua associação à hepatite pós-transfusional para, principalmente, ao uso de drogas ilegais injetáveis e outras formas menos comuns onde exista exposição de membranas e mucosas ao vírus. Podemos classificar os métodos correntes de diagnóstico do HCV em ensaios sorológicos e de detecção do RNA do HCV.

### **1.5.1. Ensaios Sorológicos**

Iniciados com a clonagem do genoma do HCV e expressão do antígeno recombinante c100-3 (derivado da região NS4 do vírus) em levedura, os ensaios sorológicos têm evoluído muito e tornaram-se disponíveis para o diagnóstico rotineiro da infecção pelo HCV. Os ensaios sorológicos de 1ª geração utilizam um único epítopo (derivado de NS4). São reativos em 80 a 90% dos pacientes testados com hepatite crônica pós-transfusional, porém não são capazes de detectar casos



de infecção recente pelo HCV. Além disso, seu uso como método de rastreamento em populações de baixo risco resulta em alta taxa de resultados falso-positivos, o que levou à introdução de ensaios *immunoblot* recombinantes, os quais se mostraram mais específicos, podendo ser usados como testes confirmatórios em pacientes exibindo positividade no ensaio sorológico. Uma limitação desse teste é o fato do mesmo poder ser afetado por níveis séricos elevados de globulinas, particularmente em pacientes com hepatite crônica ativa auto-imune (KOBAYASHI *et al.*, 1999). A introdução de ensaios sorológicos de 2ª e 3ª geração deveu-se à expressão de novos antígenos recombinantes provenientes de regiões altamente conservadas do genoma do HCV. Sua maior sensibilidade e especificidade levaram à substituição dos testes de 1ª geração. Além do antígeno c100-3, os ensaios de 2ª geração agregaram o antígeno c22-3 da região “C” (*core*) e o antígeno c33c derivado da região não estrutural NS3. Embora esses testes sejam métodos muito sensíveis para rastreamento de soropositivos para HCV e tenham quase que eliminado a ocorrência de hepatite pós-transfusional, seu resultado pode mostrar-se falso-negativo, da mesma forma que os testes de 1ª geração, por exemplo, em um grupo de indivíduos que tenham contraído a infecção pelo HCV recentemente, pois a soro-conversão pode levar até 12 semanas após a exposição inicial ao vírus. Além disso, pacientes imunossuprimidos ou imunocomprometidos podem não ser capazes de montar uma resposta imunológica sorologicamente detectável. Outra limitação desse teste é um número significativo de resultados dados como indeterminados, em algumas séries chegando a 13% (ZEIN *et al.*, 1997), sendo aventada como uma possível causa o fato do teste apresentar resultados diferentes frente aos diferentes

genótipos encontrados, o que poderia ser uma grande barreira na utilização dos mesmos em regiões distantes da onde os testes foram desenvolvidos.

Nos testes de 3ª geração, cinco antígenos recombinantes estão presentes e, como resultado, obteve-se ainda maior especificidade e sensibilidade. Apesar deste avanço, resultados indeterminados não foram eliminados, o que leva à necessidade da detecção direta do RNA do HCV (COLIN *et al.*, 2001).

### **1.5.2. Detecção do RNA do HCV**

Devido às limitações dos testes sorológicos, a detecção direta do RNA viral tornou-se uma ferramenta essencial no diagnóstico da infecção pelo HCV. Suas vantagens incluem a possibilidade do diagnóstico precoce na infecção viral aguda, diagnóstico da infecção em pacientes incapazes de montar uma resposta sorológica (pacientes imunocomprometidos, imunossuprimidos e pacientes cronicamente enfermos, tais como renais crônicos) e confirmação da infecção ativa em situações específicas (resultados indeterminados e recém-natos de mães infectadas pelo HCV) (GERMER *et al.*, 2001). Os testes de detecção do RNA do HCV são classificados em qualitativos e quantitativos.

#### **1.5.2.1 Detecção qualitativa do RNA**

Os testes qualitativos comumente utilizados para detecção do RNA do HCV são: a) RT-PCR (*reverse transcription - polymerase chain reaction*) e TMA (*Transcription Mediated Amplification*). A utilização da técnica de RT-PCR para a detecção da

presença de RNA do HCV em soro de pacientes suspeitos iniciou-se na década de 90. Esta metodologia apresenta boa sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção da infecção antes dos ensaios sorológicos, diferenciação dos casos de infecção ativa dos de resolução da infecção e diagnóstico em pacientes incapazes de formação de uma resposta imune efetiva (GARSON *et al.* 1990; ZAAIJER *et al.* 1993). O teste de TMA para o RNA do HCV, baseado, também, na amplificação de alvo molecular, tem se mostrado mais sensível que o teste de RT-PCR (ZARRACI *et al.*, 2000), apresentando grande aplicação como teste de confirmação de resposta sustentada ao tratamento.

#### 1.5.2.2 Detecção quantitativa do RNA do HCV

Os testes quantitativos têm capacidade de determinar a quantidade de RNA do HCV presente no soro de pacientes infectados (carga viral), o que tem importância prognóstico-terapêutica. Pacientes portadores de hepatite pelo genótipo 1 que não apresentam queda na carga viral de pelo menos 2 log, após 12 semanas de tratamento com Interferon- $\alpha$ /ribavirina, dificilmente obterão resposta com tratamento mais prolongado. Como requisito destes testes, espera-se que sejam acurados principalmente em relação às cargas virais encontradas em pacientes antes do tratamento ( $10^3$  a  $10^7$  genomas por mililitro de soro) e que tenham capacidade de detectar a queda desta carga em resposta ao tratamento. Já a constatação da eliminação do RNA viral dá-se pela utilização dos testes qualitativos, os quais são mais sensíveis. A quantificação do RNA do HCV é feita, atualmente, por duas metodologias principais: RT-PCR competitiva e amplificação de sinal (*branched*

*DNA*). Ambos os testes têm limites inferiores de detecção semelhante, ainda que o *branched DNA* exiba uma faixa de resolução mais ampla no que concerne aos limites superiores de detecção, evitando a necessidade, na maioria das vezes, de retestes com diluição de amostras de maior carga viral.

### **1.5.3. Testes de determinação de genótipo e subtipo do HCV**

Devido à importância clínica da determinação do genótipo do HCV, um conjunto de diferentes métodos têm sido desenvolvidos com esta finalidade (TABELA 2). Em comum estes testes buscam apresentar os melhores resultados em relação às seguintes propriedades: acurácia, precisão, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, rendimento, menor tempo de realização, menor demanda de tempo de trabalho de técnicos de laboratório e menor custo.

**TABELA 2. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO/SUBTIPO DO HCV**

MÉTODOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DE GENÓTIPO/SUBTIPO DO HCV	NOME COMERCIAL
ENSAIO ANTICORPO ESPECÍFICO (ELISA)	HCV serotyping assay (Murex)
SEQUENCIAMENTO DE REGIÃO E1 & NS5B/ANÁLISE FILOGENÉTICA	"in house" TRUGENE HCV NS5B Genotyping Kit (em desenvolvimento)
HIBRIDIZAÇÃO REVERSA COM SONDA ESPECÍFICA	Versant HCV genotype assay (LiPA) 1.0 Versant HCV genotype assay (LiPA) 2.0
POLIMORFISMO DE EXTENSAO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)	"in house"
SEQUENCIAMENTO DE REGIÃO 5'UTR	TRUGENE HCV 5' NC Genotyping Kit
PCR EM TEMPO-REAL	Abbott HCV genotyping kit
ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)	"in house"
CLIVAGEM ESPECÍFICA/FRET (TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA POR RESSOÂNCIA DE FLUORESCÊNCIA	Invader HCV genotyping assay (TWT)

#### **1.5.3.1 Determinação do genótipo através de método imunológico**

A determinação do genótipo do vírus da hepatite C através de método imunológico pode ser realizada através de teste de ELISA e Western Blot. Ambos os testes se baseiam na detecção de anticorpos contra um peptídeo genótipo-específico derivado da região NS5a. Os primeiros trabalhos da utilização deste método baseavam-se na existência de apenas dois grupos de HCV (TANAKA *et al.*, 1994). A variedade de genótipos e subtipos conhecidos hoje impede este método de uma abrangência adequada.

Estas metodologias apresentam significativamente menor sensibilidade em relação aos testes baseados em tecnologia de detecção de ácido nucléico e acentuada limitação em relação à determinação de subtipos (KOBAYASHI *et al.*, 1999; FABRIZI *et al.*, 2000). No entanto é a única metodologia potencialmente capaz de determinação de genótipo nos casos onde o HCV é eliminado e apenas anticorpos podem ser detectados.

#### **1.5.3.2 SEQUENCIAMENTO DE REGIÃO E1 & NS5b/ANÁLISE FILOGENÉTICA**

Trabalhos anteriores têm descrito o sequenciamento e análise filogenética das regiões E1 e NS5B como forma de determinação do genótipo e subtipo do HCV (SIMMONDS *et al.*, 1994). Esta metodologia permanece como padrão ouro contra a qual toda nova metodologia com a mesma finalidade deve ser comparada. A

variação nucleotídica nestas regiões reflete de maneira muito aproximada a diversidade do genoma viral existente no HCV que gerou sua classificação em inúmeros genótipos/subtipos. Este método está sendo desenvolvido em uma forma comercial sob o nome TRUGENE HCV NS5B Genotyping Kit (Bayer Healthcare).

#### **1.5.3.3 Hibridização Reversa (Versant HCV genotype 1.0)**

O método de hibridização reversa tem sido largamente utilizado para a determinação do genótipo do HCV, sendo comercializado sob o nome de Versant HCV genotype 1.0 (ANSALDI *et al.*, 2001). Baseia-se na hibridização de produtos de PCR biotinilados a sondas imobilizadas específicas. A detecção é realizada através de uma reação enzimática geradora de coloração púrpura, a qual fornece um resultado de interpretação visual. Este teste possui sondas para genótipos 1, 1a, 1b, 1a/1b, 2, 2b, 2a/2c, 3, 4, 5a e 6a. Por utilizar a região 5'UTR como alvo para a reação de PCR, este teste tem acentuada limitação na determinação do subtipo do HCV, isto se deve à alta conservação nucleotídica desta região mesmo em genótipos/subtipos diferentes. O Versant HCV genotype 1.0 é utilizado no Laboratório Central do Estado do Paraná para determinação do genótipo do HCV em pacientes que iniciarão tratamento.

Uma nova versão comercial deste método que engloba parte da região “core” (Versant HCV genotype 2.0), a qual possui maior heterogeneidade nucleotídica, aumentou de maneira estatisticamente não significativa a determinação acurada dos subtipos do HCV (13 amostras a mais em 326 estudadas) quando comparada a versão Versant HCV genotype 1.0. (VERBEECK *et al.*, 2008).

#### **1.5.3.4. Sequenciamento de região 5'UTR**

O sequenciamento semiautomatizado da região 5'UTR é comercializado como TruGene HCV 5 NC *genotyping kit* (Bayer HealthCare, Berkeley, CA). Produto de PCR purificado tendo como alvo a região 5'UTR é sequenciado de forma bidirecional por meio de primers marcados por diferentes fluoróforos, seguido de eletroforese e análise de dados pelo programa de sequenciamento *OpenGene* DNA (Bayer HealthCare). Cada sequenciamento bidirecional é alinhado automaticamente com um painel de sequências de referencia pelo programa Gene-Objects software (Bayer HealthCare), permitindo a determinação do genótipo baseado no percentual de identidade de sequência (HALFON *et al.*, 2001). Este método sofre da mesma limitação do Versant HCV genotype 1.0. no tocante a escolha da região 5'UTR como alvo da região de PCR, além de envolver etapa de sequenciamento o que demanda elevado tempo de trabalho manual, pessoal qualificado e plataforma tecnológica de alto custo nem sempre disponíveis em laboratórios de análises clínicas.

#### **1.5.3.5 Polimorfismo de extensão de fragmento de restrição (RFLP)**

Baseado em uma técnica difusamente utilizada em laboratórios de biologia molecular, este método foi pela primeira vez utilizado para a determinação do genótipo do HCV no início da década de 90. Tendo como alvo a região NS5 para amplificação por PCR seguida de digestão enzimática (*AluI*, *AccII* e *Sau96I*) foi capaz de diferenciar na maior parte das vezes os dois grupos de HCV conhecidos



então (NAKAO *et al.*, 1991). A dificuldade de encontrar enzimas de digestão para todas as variedades existentes, o tempo de manuseio e a pouca praticidade têm levado este método ao desuso no tocante a determinação de genótipo do HCV.

#### **1.5.3.6 RT-PCR em Tempo-real**

Alguns desenvolvimentos realizados na década de noventa, utilizados conjuntamente, trouxeram possibilidades consideráveis ao método tradicional de PCR: 1) emprego da atividade 5'-3' exonuclease da enzima *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase para gerar um sinal específico detectável concomitante à reação de PCR (HOLLAND *et al.*, 1991), 2) sistema de detecção de sinal fluorescente simultâneo a realização da reação de PCR (HIGUCHI *et al.*, 1992), 3) uso de sonda ligada covalentemente a fluóforo na reação de PCR (LEE *et al.*, 1993). Estes desenvolvimentos possibilitaram a criação da metodologia de PCR em tempo real, capaz de permitir a detecção do produto de PCR à medida que vai sendo formado, e não somente ao final da reação de PCR. Dessa forma, acrescentou-se ao extremamente sensível método de PCR, maior praticidade, menor tempo para obtenção do resultado e diminuição da possibilidade de contaminação cruzada (LIVAK *et al.*, 1995; HEID *et al.*, 1996; GIBSON *et al.* 1996). Não levou muito tempo para que fossem desenvolvidos os primeiros testes utilizando a PCR em tempo real para a detecção do RNA do HCV. Uma vez que este método permanece sensível e a visualização da cinética da PCR permite a resolução de uma ampla faixa de cargas virais sem a necessidade de diluição das amostras, ele vem se mostrando

como a alternativa buscada para a detecção e quantificação do RNA do HCV (TAKEUCHI *et al.* 1999; KLEIBER *et al.*, 2000; KOMURIAN-PRADEL *et al.*, 2001).

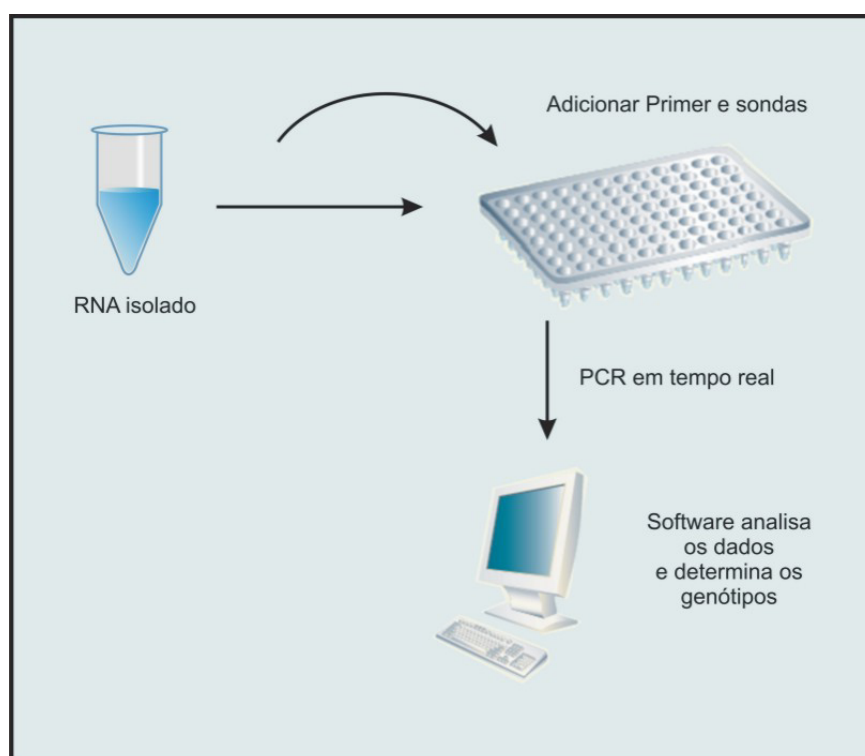
O Abbot HCV ASR é o nome comercial do método de determinação do genótipo/subtipo do HCV baseado em RT-PCR em tempo real; consiste em uma reação em "*one step*" por PCR em tempo real que utiliza sondas específicas para a determinação dos genótipos (FIGURA 5). Os "*primers*" e sondas são baseados na região 5'UTR com exceção dos genótipos 1a e 1b que utilizam "*primers*" e sondas focadas na região NS5b. A diferenciação dos subtipos outros que *não* 1a e 1b tem um desempenho igual a outras metodologias focadas na região 5'UTR (WECK *et al.*, 2005).

Estudos prévios mostraram uma boa correlação com o Versant HCV genotype 1.0, mas indicam que a sonda do genótipo 4 não tem a especificidade esperada e pode ocorrer uma falha na identificação desse genótipo (RADZIEWICZ *et al.*, 2004). Outro estudo mostra que houve uma diferença na eficiência da reação para os diferentes genótipos do HCV. Esta variabilidade dificultou a utilização dos valores de Ct (*cycle threshold*) mostrando que há necessidade de sondas com especificidade e eficiência maiores.

Na tese de doutorado, recentemente submetido ao Journal of Clinical Microbiology para publicação, Nakatani (2008), desenvolveu um método baseado em RT-PCR em tempo-real para a determinação do genótipo do HCV tendo a região NS5b como alvo molecular. O método consiste em uma duas reações "*one-step*" RT-PCR em tempo-real paralelas, uma para a detecção dos subtipos 1a,1b e 3a e outra para a detecção dos subtipos 2a,2b e 2c. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram uma concordância na determinação do genótipo e subtipo do

HCV de 100% quando comparado ao sequenciamento/análise filogenética, além de demonstrar alta sensibilidade (97,8%). Parte das amostras analisadas por este método foram gentilmente cedidas para também serem testadas pelo teste de microarranjo, objeto do presente trabalho.

**FIGURA 5-** ILUSTRAÇÃO DO ESQUEMA DO MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL



FONTE: Weck (2005)

#### 1.5.3.7 ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)

O método de Espectrometria de massa (MALDI-TOF) foi empregado pela primeira vez na determinação genotípica do HCV em 2005. Após RT-PCR o amplicon é submetido a uma reação de minisequenciamento, este é purificado e obtido seu

espectro de massa (Reflex IV ,Bruker Daltonics, Germany). O genótipo é inferido a partir de um painel de controles, com relação genótipo/espectro de massa bem determinados. O método é capaz de determinar corretamente os genótipos 1a, 1b,2a,3a e 4 acuradamente. Embora possivelmente de menor custo que o método de sequenciamento e acurado, sua realização envolve tecnologia não disponível na imensa maioria dos laboratórios de análises clínicas, pessoal técnico altamente especializado e elevado manuseio e tempo (ILINA *et al.*, 2005).

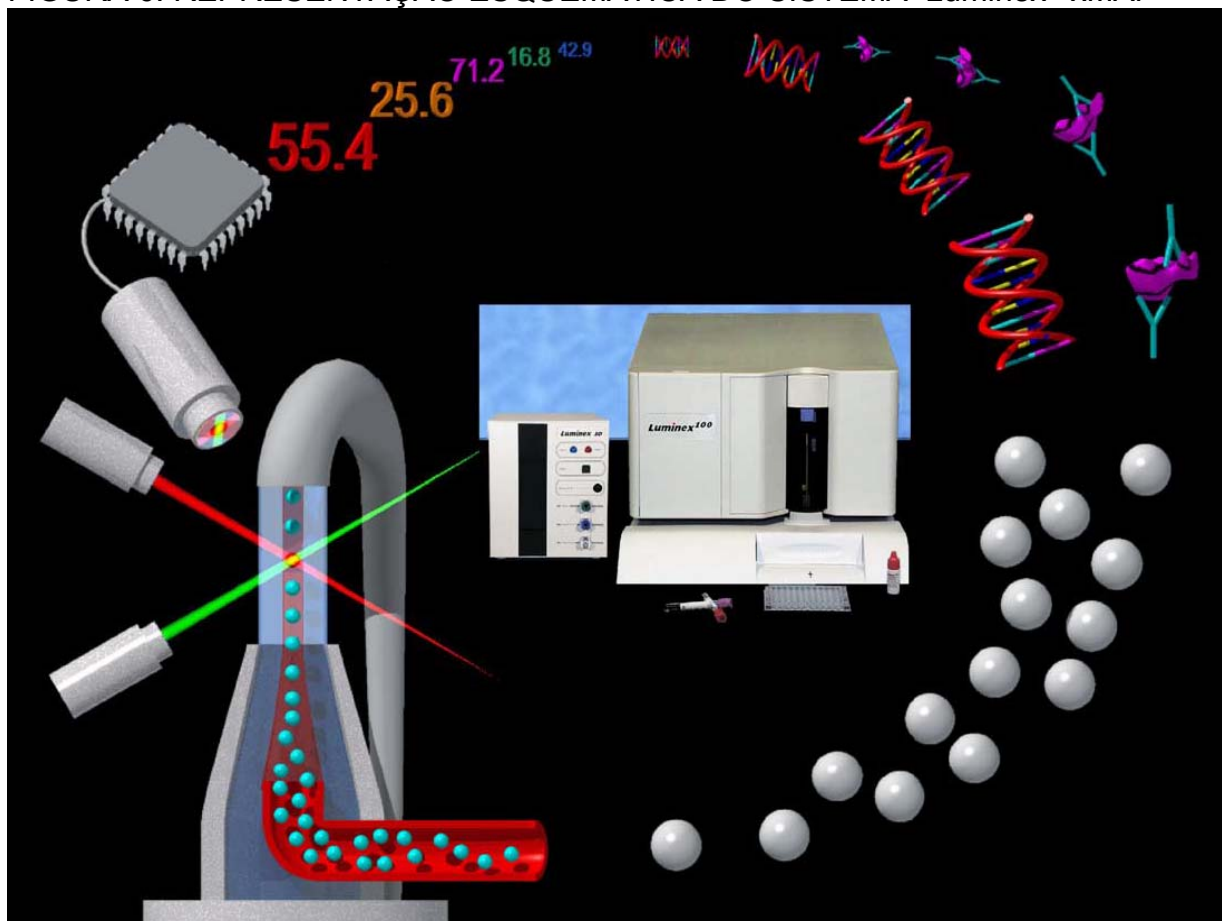
#### **1.5.3.8 Teste baseado em sondas e sítios de clivagem específicos**

Teste comercializado com o nome de **Invader** HCV Genotyping **Assay**, version 1.0; Third Wave Technologies, é baseado em duas reações em sequência: 1) hibridização genótipo específicas de sondas contenedoras de sítio de clivagem a produto de PCR, gerando um flap 5', 2) ligação deste flap de maneira específica em um cassete FRET, o que acarretará uma nova reação de clivagem a qual libera o fluoróforo repórter do seu *quencher* e permite a leitura do ensaio. Embora apresentando concordância 98% em relação a determinação de genótipo quando comparado ao TRUGENE HCV 5' NC Genotyping Kit, este método tem como alvo a região 5'UTR consequentemente sofrendo da mesma limitação quanto a determinação de subtipo que todos testes baseados nesta região apresentam.

### 1.5.3.9 Microarranjo Líquido (Luminex® x MAP)

Um dos primeiros relatos do uso de citometria de fluxo para análise de imunoensaaios utilizando microesferas foi publicado no final da década de 70 (HORAN *et al.*, 1977). Desde então inúmeros avanços têm sido realizados no aperfeiçoamento e expansão da utilização desta técnica. A tecnologia de microarranjo líquido, especificamente representada pelo sistema Luminex® xMAP (FIGURA 6.) permite não somente a realização de imunoensaaios sobre a superfície de microesferas como também ensaios baseados em tecnologia de biologia molecular.

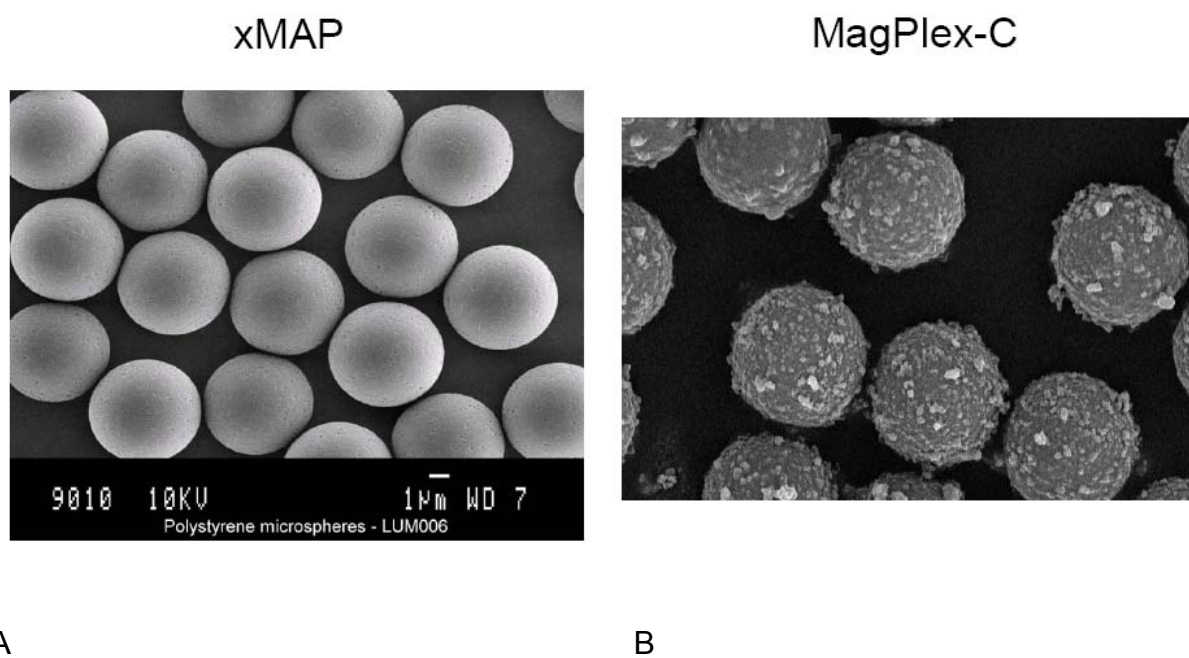
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA Luminex® xMAP



Este sistema possui quatro componentes básicos: 1º) a utilização dos mesmos princípios e reagentes utilizados nos principais métodos de diagnósticos, sejam eles

testes imunológicos ou baseados em tecnologia de biologia molecular, 2º) o uso de microesferas sobre as quais uma das moléculas envolvidas na reação encontra-se ligada de forma covalente, 3º) sistemas fluídico responsável pela disponibilização das microesferas até o sistema ótico o qual promove o estímulo luminoso e captação da emissão proveniente dos fluoróforos e 4º) *Hardware* e *software* que promovem a conversão, em alta velocidade, dos sinais de fluorescência obtidos em valores numéricos em tempo-real. As microesferas de poliestireno (5,6  $\mu\text{m}$ , FIGURA 7.) contêm em seu interior dois fluoróforos com espectros de emissão distintos.

FIGURA 7. IMAGEM À MICROSCÓPICA DE VARREDURA DAS MICROESFERAS. A. MICROESFERAS SEM CONSTITUIÇÃO METÁLICA. B. MICROESFERAS COM REVESTIMENTO METÁLICO.



Através da utilização da combinação de diferentes proporções dos dois fluoróforos, são criados cem conjuntos de esferas com endereços espectrais distintos. Cada conjunto de microesferas pode possuir sua sonda específica de oligonucleotídeo.

Uma vez que cada conjunto de microesferas possui um endereço espectral específico que lhe identifica, estes conjuntos podem ser combinados e até cem diferentes produtos de PCR diferentes podem ser analisados simultaneamente em uma única e mesma reação. Um terceiro fluoróforo ligado a uma das fitas do produto de PCR sinaliza a ocorrência de reação de hibridização à sonda ligada à microesfera. As microesferas são interrogadas individualmente a medida que passam (sistema fluídico) por dois laser separados (sistema ótico). Um laser diodo excita os dois fluoróforos que estão contidos na microesferas a 635 nm ; um laser yttrium aluminium garnet (YAG) excita o fluoróforo ligado a fita de DNA (comumente ficoeritrina ou Cy3) hibridizada. O sistema de processamento de sinal digital classifica as microesferas, baseado em seus endereços espectrais, e detecta a ocorrência de reação ou não na superfície da microesfera a partir do sinal proveniente do terceiro fluoróforo. Milhares de microesferas são interrogadas por segundo, o que resulta em um sistema de análise capaz de reportar a ocorrência de até cem reações diferentes em um único poço por amostra em alguns segundos (DUNBAR *et al.*, 2006). A intensidade de fluorescência (FI) de pelo menos cem microesferas de cada conjunto é computada; o resultado da reação específico de cada conjunto de microesferas é dado pela mediana destes valores de fluorescência (MFI). O formato de ensaio baseado em tecnologia da biologia molecular que utiliza o sistema descrito é o da hibridização direta de DNA. Este ensaio baseia-se na hibridização de produtos de PCR marcados com fluoróforo em sondas de captura ligadas às superfícies das microesferas . Este método é particularmente interessante para detecção de polimorfismo de apenas um único nucleotídeo. Uma vez que utilizando-se sondas de cerca de vinte nucleotídeos a temperatura de desnaturação

pode variar em vários graus entre uma hibridização exatamente complementar e outra em que ocorra discordância no pareamento de uma única base (IKUTA *et al.*, 1987; LIVSHITS *et al.*, 1996). A concepção de sondas de captura e primers para ensaios de microarranjo leva em consideração a presença de cloreto de tetrametilamônia (TMAC) nos tampões de hibridização. O TMAC estabiliza o pareamento AT e diminui a variação na TM de uma hibridização conforme o maior ou menor conteúdo CG (JACOBS *et al.*, 1988; WOOD *et al.*, 1985). Tampões de hibridização que contêm TMAC a 3 ou 4M equalizam a TM de diferentes sondas, permitindo que sondas com características diferentes sejam utilizadas sob as mesmas condições de hibridização (MASKOS *et al.*, 1992 e 1993). Para a discriminação de um único nucleotídeo, o desenho da sonda de captura (de vinte nucleotídeos de extensão, por exemplo) deve preferencialmente posicionar este nucleotídeo no centro da sonda. O pareamento incorreto no centro da sonda acarreta uma maior instabilidade na hibridização do que ocorre quando este se dá mais próximos das extremidades 5' ou 3' (GOTOH *et al.*, 1995). A sonda de captura deve ser modificada em suas extremidade 5' através da ligação de um grupo amino e um espaçador de carbono (12 átomos de carbono são frequentemente usados), isto possibilita sua ligação às microesferas de poliestireno que por sua vez possui grupos carboxilato ligados a sua superfície. Em uma solução tampão que contenha EDC, uma ligação carbodiimida liga de forma covalente a sonda à microesfera (FULTON *et al.*, 1997; DUNBAR *et al.*, 1997). As condições ideais para um ensaio são determinadas através da avaliação do impacto da temperatura de hibridização, da extensão da sonda e da quantidade de produto de PCR na sensibilidade e especificidade do mesmo. A consequência do pareamento incorreto (não



complementar) é maior quanto em temperaturas maiores e quando as sondas são menores (ARMSTRONG *et al.*, 2000; LIVSHITS *et al.*, 1996). Desta forma, a discriminação pode ser melhorada através do aumento da temperatura de hibridização e/ou diminuindo a extensão da sonda. Após experimentos com amostras de DNA de referência e sob condições de hibridização padrão, nucleotídeos podem ser adicionados às extremidades 5' e 3' para aumentar a sensibilidade do ensaio ou removidos para ganho em especificidade. Mesmo levando em consideração o que foi descrito acima, em algumas situações é necessário o deslocamento, no desenho da sonda, do nucleotídeo polimórfico. Isto é necessário algumas vezes para que se evite a formação de estruturas secundárias; para tanto, geralmente é suficiente manter a posição deste nucleotídeo entre as posições 8 e 14 de uma sonda composta de vinte nucleotídeos. Os primers selecionados geram um produto de amplificação que possui entre 100 e 300 pares de bases, contendo a região de interesse para a hibridização sendo que um dos primers é biotilado em sua extremidade 5' para posterior ligação à estreptoavidina-ficoeritrina. A utilização de um produto de PCR menor diminui a possibilidade de falha na hibridização devido a impedimentos relacionados a conformação molecular. Contudo, produtos de PCR de até 1200 pares de base têm sido usados com sucesso, indicando a importância, na eficiência da hibridização, da sequência do produto de PCR em si e suas conseqüentes estruturas secundárias (DIAZ *et al.*, 2004).

A cinética de hibridização e afinidade termodinâmica de seqüências exatamente complementares ou não, sofrem influência das concentrações dos reagentes envolvidos nesta reação (WETMUR *et al.*, 1991).

Em concentrações acima do nível de saturação, a eficiência da hibridização com a sonda ligada à microsfera pode diminuir presumivelmente devido à competição com a fita complementar do produto de PCR, o qual tende a sofrer renaturação (ARMSTRONG *et al.*, 2000)

## 2.OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

- Desenvolver um método para a determinação do genótipo e subtipo do HCV presente em amostras de plasma de pacientes sabidamente portadores do vírus. Este método deve ser acurado, preciso, sensível, específico e reprodutível.
- Construir o teste de modo que o mesmo tenha como alvo molecular mais do que uma região do genoma viral.
- Este método deve ser capaz de possuir as características supracitadas em sua utilização em território nacional. Devido à diferente distribuição genotípica do HCV em diferentes localizações geográficas e tendo o Brasil sua epidemiologia característica, este teste foi desenvolvido para determinação genotípica e subtípica de variantes encontradas no Brasil.
- Comparar o desempenho do teste, por este trabalho desenvolvido, com produto comercial já amplamente utilizado e aprovado pelo FDA americano, tendo como referência padrão o sequenciamento da região NS5b para resolução de discrepâncias.
- Utilizar a tecnologia de microarranjo líquido como plataforma deste teste.
- Desenvolver o teste de forma que apresente custo menor que o teste utilizado no Brasil atualmente para atender a demanda interna.
- Formatar o teste de modo a permitir futuras adaptações para detecção de outros patógenos nas mesmas amostras de plasma simultaneamente.

### 3. JUSTIFICATIVAS

-A prevalência da hepatite C no Brasil é elevada, além disso é imperativa a necessidade da determinação do genótipo do HCV em todos pacientes antes do início do tratamento. Atualmente no Brasil os testes de determinação de genótipo são realizados com *kits* importados a custo elevado, não estando disponíveis em muitos estados. O desenvolvimento de um ensaio nacional, evitando importação, de alto rendimento e a um custo menor seria altamente desejável. A difusão em todo território nacional deste teste, com a redução dos custos envolvidos com a importação de *kits* de elevado custo, poderia vir a fazer parte de um programa de controle da hepatite C. Sabe-se que os custos envolvidos com tal programa seriam elevados uma vez que envolveriam custos com diagnóstico e tratamento entre outros. Entende-se que cada segmento de tal programa que possa ser realizado com a máxima independência de tecnologia externa possível é altamente desejável.

-Este teste terá como alvo molecular duas regiões distintas do genoma viral. Nenhum método atual comercial ou “in house” possui esta característica. Com isso tem-se como objetivo não somente a confirmação dos resultados encontrados através da análise de duas regiões independentes, mas a eventual detecção de casos de recombinação genotípica, que têm sido descritos.

-A limitação do teste, a ser desenvolvido, para detecção dos genótipos/subtipos encontrados no Brasil envolve uma questão de relação custo-benefício. Primeiramente os genótipos/subtipos encontrados em território nacional são virtualmente os mesmos encontrados no restante do continente americano e na Europa ocidental. Os genótipos 4, 5 e 6 são encontrados principalmente na África e

ásia. A obtenção de amostras em número suficiente aumentaria o custo e tempo para desenvolvimento do teste. Apesar de não ser o objetivo imediato deste projeto, a extensão do mesmo para que passasse a contemplar todos os genótipos seria factível, considerando a plataforma tecnológica escolhida.

-A comparação com um método comercial e amplamente utilizado na determinação do genótipo/subtipo do HCV se faz necessária uma vez que espera-se que o mesmo apresente no mínimo um desempenho semelhante. Se isso ocorrer, os custos comparativos assumem papel de maior importância. Uma vez que o sequenciamento da região NS5b é o padrão de referência, o mesmo foi escolhido neste trabalho. Por ser o Versant HCV genotype assay 1.0 o método mais amplamente utilizado no Brasil, ele foi escolhido como comparativo.

-A escolha da tecnologia de microarranjo líquido como plataforma para o desenvolvimento deste ensaio deve-se a algumas características que a mesma apresenta: (i) capacidade de realização de múltiplos ensaios simultaneamente, em uma única reação e a partir de uma única amostra; (ii) alto rendimento no processamento de amostras; (iii) capacidade de futuras adições de novos ensaios para detecção de outros patógenos de interesse e mesmo a subtração de ensaios que deixem de ser necessários e (iv) baixo custo quando se considera a realização de múltiplos ensaios simultaneamente utilizando os mesmos reagentes que seriam usados separadamente em outras condições.

-A realização deste trabalho ainda visa como subproduto a qualificação de pesquisadores brasileiros no desenvolvimento e utilização de ferramentas específicas dos testes baseados em biologia molecular para futuros projetos e formação tecnológica.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Amostras de plasma**

O sangue total foi coletado em tubos Vacutainer<sup>®</sup> (Becton-Dickinson, Plymouth, United Kingdom), contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético) para a extração do RNA do HCV. Foi, então, centrifugado dentro de no máximo 2 horas e o plasma separado em frasco livre de Rnase e Dnase e acondicionado a – 20°C até o momento da extração do RNA. Estas amostras foram utilizadas anteriormente para realização de testes para determinação do genótipo do HCV através dos métodos de sequenciamento/análise filogenética da região NS5b, Versant HCV genotype 1.0 e um método *in house* baseado em RT-PCR em tempo-real.

### **4.2 Extração do RNA**

O RNA do HCV foi extraído de acordo com o método de Boom (BOOM *et al.*, 1990) utilizando partículas de sílica magnetizadas de acordo com as instruções do fabricante, Nuclisens<sup>®</sup> Magnetic Extration Reagents (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands) como se segue: o tampão de lise foi previamente colocado em banho maria a 37°C por 30 minutos para a dissolução dos cristais presentes. O RNA foi extraído a partir de 200 µl do plasma adicionado a 2000 µl do tampão de lise (tiocianato de guanidina 5 mol/L, triton X-100, Tris HCl, pH:7,4). Os tampões de lise com as amostras foram mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionaram-se 50 µl de sílica magnetizada (que serve como fase sólida e tem como característica

elevada concentração de sal, o que permite que os ácidos nucleicos se liguem às partículas de sílica magnetizadas), sendo estas amostras mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados por 2 min a 1500 Xg. Realizaram-se os procedimentos de purificação em uma estante com placa magnetizada com 400 µl tampão de lavagem 1 (tiocianato de guanidina) e com 500 µl de tampão de lavagem 2 (tampão orgânico, solução biocida) por 2 vezes cada. Em seguida, foram lavadas com tampão de lavagem 3 (tampão inorgânico) e eluídos com 25 µl de tampão de eluição (tampão inorgânico) a 60°C por 5 min com agitação de 1400 rpm. Por fim, o eluído foi separado da sílica, acondicionado em tubos de rosca e colocado para a reação de transcrição reversa. Foram realizadas 89 reações de extração sendo 80 reações em amostras sabidamente positivas para o HCV por teste prévio (sequenciamento/análise filogenética da região NS5b, Versant HCV genotype 1.0 e um método *in house* baseado em RT-PCR em tempo-real), amostras de plasma positivas para HIV, HBV, HVA e dengue (duas amostras de cada patógeno) e uma amostra de plasma HCV negativo.

#### **4.3. Desenho dos oligonucleotídeos**

Baseado em seqüências consenso para os genótipos e subtipos: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c e 3a obtidas na base de dados do Los Alamos National Laboratory (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>) desenharam-se *primers* para a amplificação das regiões 5'UTR e NS5b e sondas de complementaridade específica para porção interna destes segmentos a serem amplificados (TABELAS 3, 4, e 5), estas sondas foram posteriormente ligadas (ligação covalente) a

microesferas de poliestireno que compõem a plataforma tecnológica utilizada neste trabalho. Ao todo quatro conjunto de primers e dezesseis sondas foram desenhadas. Além disso, dezesseis oligonucleotídeos sintéticos complementares às sonda foram concebidos para posterior realização de reação de hibridização destes às sondas, confirmando a ligação destas às microesferas . Os *primers forward* e os oligonucleotídeo sintéticos foram modificados em sua extremidade 5' com uma molécula de biotina e as sondas também sofreram modificação em sua extremidade 5' com um grupo amina e um espaçador de carbono (C-12), o que possibilita sua ligação às microesferas.

**TABELA 3. PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES 5'UTR e NS5b.**

<b>PRIMERS</b>	<b>modificação</b>	<b>Sequência 5'→3'</b>	<b>localização*</b>
HCV1F (5'UTR)	biotina	CGG GAG AGC CAT AGT GGT	130-147
NONS5BF (NS5b)	biotina	ACM AAG CYC AAA CTC ACT CCA WT	1597-1621
HCVRX (5'UTR)		CGC RAC CCA ACR CTA CT	256-273
NONS5BR (NS5b)		CAY GMG ACA CGC TGT GA	1685-1702

\*Sequência de referência (GenBank, AF009606)



**TABELA 4. SONDAS DE CAPTURA DA REGIÃO 5'UTR**

nome da sonda- genótipo/subtipo	modificação	Sequência 5'→3'	localização*
U11- (1)	amino-12C	ACC CGG TCG TCC TGG CAA TT	179-198
U3A1- (3a)	amino-12C	ACC CGG TCA CCC CAG CGA TT	179-198
U2A/CX- (2a & 2c)	amino-12C	ACC CAG TCT TCC CGG CAA TT	179-198
U2A/CY- (2a & 2c)	amino-12C	ACC CGG TCT TCC CGG CAA TT	179-198
U2BX- (2b)	amino-12C	ACC CAG TCT TTC CGG TAA TT	179-198
U2BY- (2b)	amino-12C	ACC CAG TCT TTC CGG CAA TT	179-198

\*Sequência de referência (GenBank, AF009606)

**TABELA 5. SONDAS DE CAPTURA DA REGIÃO NS5b.**

nome da sonda- genótipo/subtipo	modificação	Sequência 5'→3'	localização*
NS5B1A-(1a)	amino-12C	GTA GCC AGC CGT GAA CCA	1652-1668
NS5B1BX-(1b)	amino-12C	GTA ACC AGC AAC GAA CCA	1652-1668
NS5B1BY-(1b)	amino-12C	GTA GCC AGC AAT GAA CCA	1652-1668
NS5B1C-(1c)	amino-12C	GTA ACC GCC CGT GAA CCA	1652-1668
NS5B2AX-(2a)	amino-12C	GGC GCC GAC AGT GAA CCA	1652-1668
NS5B2AY-(2a)	amino-12C	GGC GCC GAC GGT AAA CCA	1652-1668
NS5B2B-(2b)	amino-12C	GGC GCC CAC GGT GAA CCA	1652-1668
NS5B2C-(2c)	amino-12C	AGC GCT GAC GGT GAA CCA	1652-1668
NS5B3AX-(3a)	amino-12C	GAC ACC AAC CGT AAA CCA	1652-1668
NS5B3AY-(3a)	amino-12C	GAC GCC AAC CGT AAA CCA	1652-1668

\*Sequência de referência (GenBank, AF009606)

#### 4.4. Reação de transcrição reversa e de PCR

Como o HCV possui seu genoma composto de RNA, antes da PCR é necessária a obtenção do DNA complementar (cDNA) através de reação de transcrição reversa. Foram realizadas 89 reações de transcrição reversa sucedidas de PCR. Para tanto foi utilizado o *kit* Omniscript® Reverse Transcription. Este *kit* utiliza uma solução tampão 10x, 2µl; dNTP mix (5 mM cada) 2µl; 10 UI de inibidor da RNase; Omniscript Reverse Transcriptase, 1µl e random primers 2 µg/ µl. A estes componentes adiciona-se RNA 12,75 µl previamente mantido a 65°C por 5 minutos e colocado em gelo posteriormente. O volume final de reação de 20 µl é mantido por uma hora a 37°C.

Sucedese à reação de transcrição reversa a realização de PCR *multiplex*. Utiliza-se a enzima TaqPolimerase, 0,25µl; solução tampão 10x, 5µl; MgCl<sub>2</sub> 50mM 1,5µl; d NTP 2,5 mM 4 µl; primers forward HCVF biotina-5' CGGGAGAGCCATAGTGGT 3' , concentração final de 200 n M; NSNOF biotina-5' ACMAAGCYCAAACCTCACTCCAWT 3' , concentração final de 1000 n M; HCVRX 5' CGCRACCCAACRCTACT 3' , concentração final de 200 n M; NSNOR 5' CAYGMGACACGCTGTGA 3' , concentração final de 1000 nM e 5 µl de cDNA. O volume final de 50 µl é submetido às seguintes condições de termociclagem: 94°C por 60"; 35 ciclos de 94°C por 30", 56.8°C 30" e 72°C 60" e uma etapa final de 72°C por dois minutos.

#### **4.5. Ligação das sondas às microesferas de poliestireno**

A ligação das sonda às microesferas foi realizada segundo uma modificação do protocolo desenvolvido pela Luminex®. Foram ligadas dezesseis sondas para hibridização específica à fita de DNA contenedora do primer biotinilado, proveniente da PCR. Sendo que seis destas sonda foram desenhadas para a região interna do produto de PCR da região 5'UTR. Outras dez sondas foram concebidas com as mesmas características, porém para a região NS5b. A versão da plataforma Luminex® utilizada neste trabalho conta com 100 conjuntos diferentes de microesferas, cada conjunto diferindo nas proporções de dois fluoróforos distintos contidos dentro das microesferas. Cada sonda é ligada a um único conjunto de esferas em uma reação separada, deste modo por exemplo pode-se ligar em uma placa de ELISA 96 sondas a 96 conjuntos de microesferas diferentes. Cada conjunto de microesferas possui um código numérico, designado pelo fabricante, que possibilita saber qual sonda está ligada a qual conjunto em específico. Esta informação é fundamental para a realização da reação de microarranjo líquido. Transfere-se 500.000 microesferas suspensas em 50 µl para um poço de uma placa de ELISA sobrejacente a um separador magnético. Após sessenta segundos remove-se o sobrenadante e ressuspende-se as microesferas em 50 µL de 0.1 M MES, pH 4.5. Adiciona-se 2 µl de uma solução 100Mm de apenas uma das sondas modificadas em suas extremidades 5' com grupo amino e espaçador de carbono. À cada reação adiciona-se 2,5 µl de EDC diluído em água para uma concentração de 10 mg/ml. Incuba-se esta reação por 30 minutos em uma sala escura à temperatura ambiente. Repete-se a adição de uma nova alíquota de EDC recentemente

preparada à reação e incuba-se por mais 30 minutos. Duas lavagens são realizadas com 200 µL de Tween-20 0.02%, seguidas de duas lavagens com 200µL 0.1% SDS, ambas realizadas sobre o separador magnético. Após a retirada do sobrenadante ressuspende-se as esferas em 100 µL de TE, pH 8.0. A etapa final compreende a contagem das microesferas através de um hemocitômetro. As microesferas são então mantidas entre 2 e 8°C protegidas da luz.

#### **4.6. Confirmação da ligação das sondas às microesferas**

A confirmação da ligação das sonda às microesferas (ligação covalente) através do grupo amino (modificação 5') ao grupamento carboxila (ligado à microesfera) em um ambiente químico contendo EDC é realizada pela reação de hibridização dos oligonucleotídeos sintético, modificados com biotina em suas extremidades 5', às sondas supostamente ligadas às microesferas. Esta reação de hibridização foi realizada segundo o protocolo sugerido pela Luminex<sup>®</sup>. Resuspende-se as microesferas por 20 segundos com o auxílio de *vortex* e sonicação. Preparo de uma solução de hibridização contendo 150 microesfera de cada conjunto por microlitro de TMAC 1.5X. Para cada reação adicionar 33µl da solução de TMAC 1.5X, 200 femtomoles de oligonucleotídeos sintéticos biotinilados e TE p H 8.0 em um total de 17 µl, perfazendo um volume total de reação de 50 µl. Esta reação é submetida à temperatura de 100 °C por 3 minutos seguida de 50°C por quinze minutos. A etapa final compreende a adição de 25µl de uma solução de estreptoavidina-ficoeritrina a 10µg/ml (diluída em TMAC 1X), mantendo a temperatura de 50°C por mais cinco minutos; esta etapa tem como finalidade a marcação com o fluoróforo do

oligonucleotídeo complementar hibridizado à sonda. Após esta última etapa a reação é analisada pela plataforma Luminex®. Foram realizadas dezesseis reações separadas, sendo cada oligonucleotídeo biotinilado colocado em reação onde estava presente somente as sondas (ligadas às microesferas) suas complementares.

#### **4.7. Hibridização dos produtos de PCR com as sondas ligadas às microesferas.**

Foram realizadas 90 reações de hibridização, em duplicata, a partir das reações de PCR com as sondas ligadas às microesferas. Resuspende-se as microesferas por 20 segundos com o auxílio de vortex e sonicação. Preparo de uma solução de hibridização contendo 150 microesfera de cada conjunto por microlitro de TMAC 1.5X. Para cada reação adicionaram-se 33µl da solução de TMAC 1.5X/microesferas, 10 µl da PCR e 7 µl de TE pH 8.0 perfazendo um volume total de reação de 50 µl. Esta reação é submetida à temperatura de 100 °C por 5 minutos seguida de 50°C por quinze minutos. A etapa final compreende a adição de 25µl de uma solução de estreptoavidina-ficoeritrina a 10µg/ml (diluída em TMAC 1X), mantendo a temperatura de 50°C por mais cinco minutos; esta etapa tem como finalidade a marcação com o fluoróforo da fita de DNA hibridizada à sonda. Acrescente-se que o mesmo procedimento de hibridização foi realizado com dez amostras de PCR controle (denotando ausência de cDNA) e 10 amostras somente contendo a solução de hibridização TMAC 1.5X e TE pH 8.0.(background). Após esta última etapa a reação é analisada pela plataforma Luminex®. Observe-se que uma única alíquota de 10 µl da PCR está em contato com as dezesseis sondas, em um único poço de reação simultaneamente.

#### 4.8 Leitura da reação de hibridização e obtenção dos dados.

A leitura dos resultados das reações de hibridização é feita através da plataforma tecnológica Luminex 100<sup>®</sup> mantendo-se a temperatura de hibridização de 50°C . O sinal de fluorescência obtido de cada um dos dezesseis conjuntos específicos de microesferas em cada reação de hibridização é computado (MFI). Também são computados os mesmos sinais para cada reação de PCR controle (denotando ausência de cDNA) e para cada reação contendo somente a solução de hibridização TMAC 1.5X e TE p H 8.0 (*background*). Obtem-se a média do MFI, de cada conjunto específico, provenientes das 10 reações de background. Subtrai-se os dezesseis MFI encontrados em cada reação de hibridização e reação de PCR controle da média dos background. Com isso obtem-se os valores de MFI acima do background (net MFI). É considerado um sinal específico de hibridização aquele maior que a soma da média dos valores de background com o produto de dez vezes o desvio padrão desta média (fórmula).

sinal de hibridização específico  $\leftrightarrow$  net MFI > média do MFI do background + (10xSD)

A fórmula acima determina o *cutoff* utilizado no ensaio.

Em casos onde ocorra sinal de hibridização proveniente de mais de um conjunto de sondas (situações onde a relação sinal/ruído diminui), considera-se positiva aquele conjunto em que a divisão de seu MFI pela soma dos demais resulte em uma fração maior que 0,6 . Quando houver duas sondas para um mesmo genótipo/subtipo, seus respectivos MFI são somados e a mesma operação é efetuada.

#### **4.9. Análise estatística**

As análises estatísticas de coeficiente de Kappa (Cohen) entre os métodos foram realizadas no programa MedCalc® para Windows, através da determinação do coeficiente de Kappa (THOMPSON *et al.*, 1988).

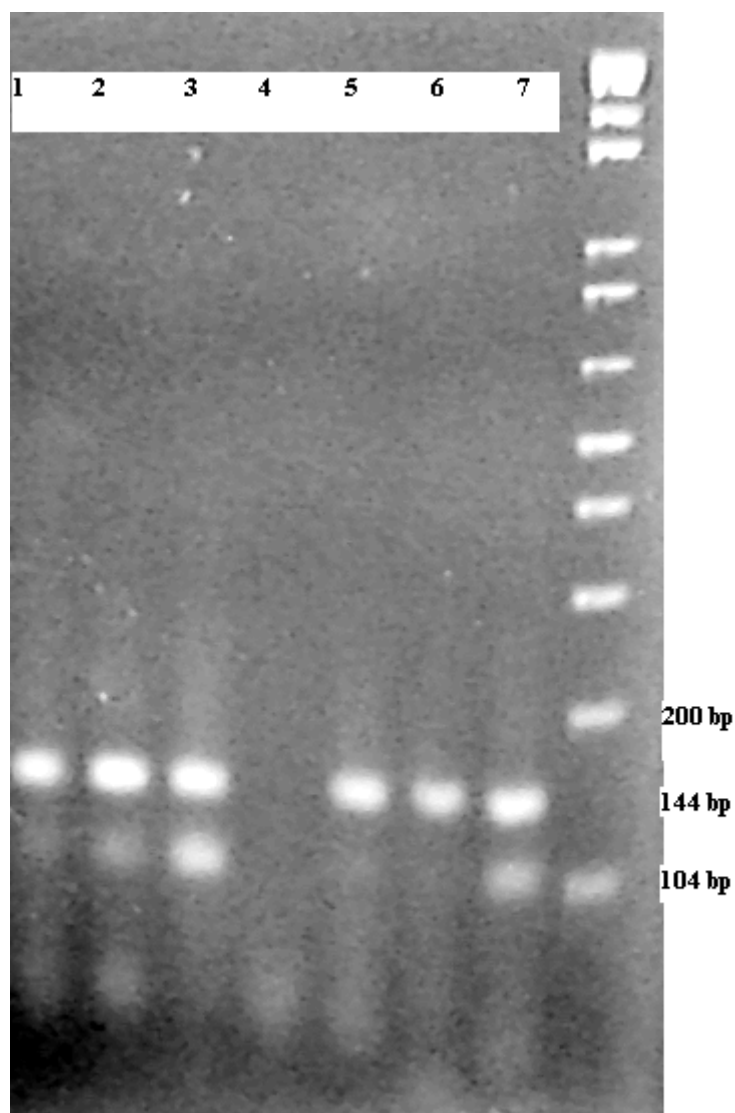


## **5.RESULTADOS**

### **5.1 Eficiência da RT-PCR.**

A base deste teste de microarranjo encontra-se em uma reação de transcrição reversa seguida de uma PCR. Das oitenta amostras positivas para a presença do HCV houve amplificação da região 5'UTR em setenta e seis amostras e das regiões 5'UTR e NS5b conjuntamente em trinta e nove amostras. Em nenhuma das amostra houve amplificação apenas da região NS5b. Correlacionando com o resultado obtido no microarranjo líquido, observou-se sinal de hibridização específica referente às duas regiões em todas as amostras onde houve amplificação das duas regiões à PCR; com exceção de duas amostras onde houve amplificação das duas regiões e apenas sinal específico proveniente da hibridização referente às sondas 5'UTR. A baixa eficiência na amplificação simultânea das duas regiões genômicas (39/80, 49%) foi responsável pela incapacidade do teste em determinar o subtipo em pelo menos vinte duas amostra das setenta e seis em que o genótipo foi determinado com sucesso. A ilustração a seguir (FIGURA 8) fornece uma amostra dos produtos de PCR obtidos.

**FIGURA 8.** FOTOGRAFIA DE GEL DE ELETROFORESE.



**1,2,3e7 – Amplificação das regiões 5'UTR (144bp) e NS5b(105bp).**

**5e6 \_ Amplificação apenas da região 5'UTR .**

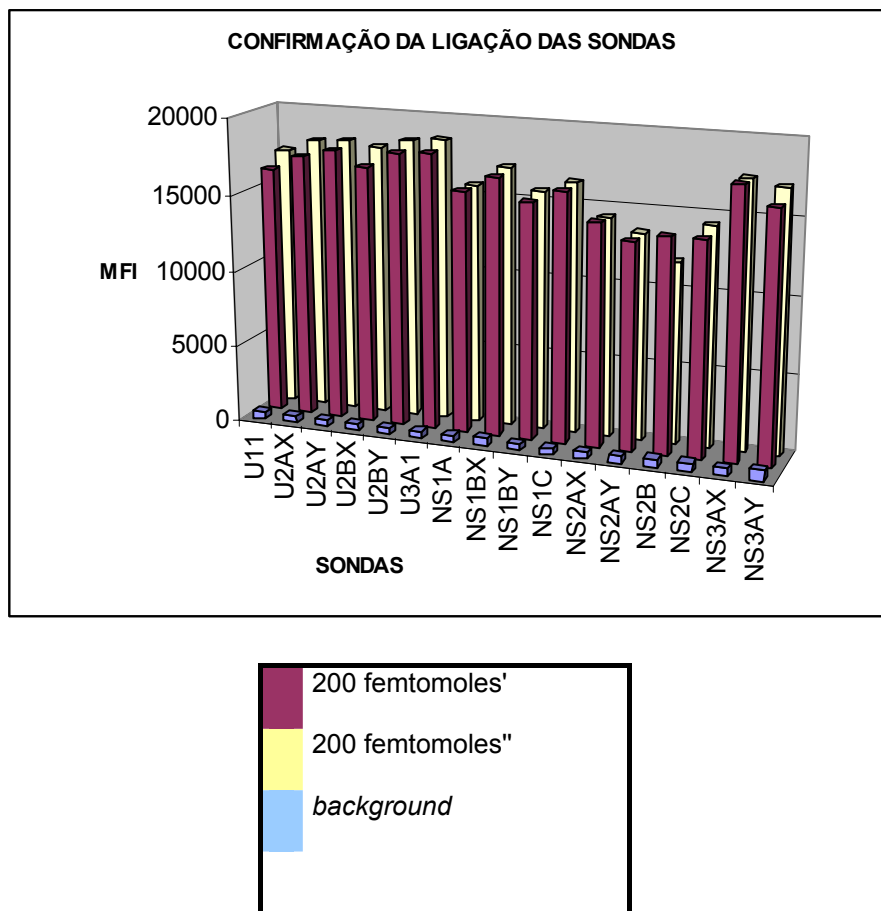
**4 \_ Não houve amplificação.**

**Marcador 1 kb *plus DNA ladder* (Invitrogen®).**

## **5.2 Confirmação da ligação das sondas às microesferas**

A reação de confirmação da ligação das sondas às microesferas foi realizada conforme descrito. Houve obtenção de sinal de hibridização específica com todas as sondas de captura testadas frente seus respectivo oligonucleotídeos sintéticos complementares (FIGURA 9.). Isto indica a eficiência da ligação das sondas de captura às microesferas (acoplamento) e também a hibridização efetiva, nas condições de temperatura e de tampão empregados. Além disso, ainda que esta hibridização não se traduza obrigatoriamente na mesma eficiência quando da hibridização com produto de PCR, pelo fato de aqui se tratar de um oligonucleotídeo de exato tamanho e menos sujeito a possíveis conformações moleculares que dificultem a hibridização, ao menos é um indicador objetivo que na sonda em si não há formação de estruturas secundárias proibitivas. Os valores de MFI obtidos foram os esperados segundo descrito pela literatura.

**FIGURA 9.** MFI DA HIBRIDIZAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS COMPLEMENTARES E BACKGROUND



### 5.3 Sensibilidade do ensaio na determinação do genótipo e subtipo do HCV

Das oitenta amostras sabidamente positivas para a presença do HCV através do teste prévio pelos métodos de sequenciamento/análise filogenética da região NS5b, Versant HCV genotype 1.0 e um método *in house* baseado em RT-PCR em tempo-real, foi obtido sinal específico de hibridização capaz de determinar o genótipo do HCV em setenta e seis amostras (76/80, sensibilidade de 95%). Em cinquenta e duas amostras foi possível determinar além do genótipo do HCV, o subtipo responsável pela infecção (52/76, sensibilidade para determinação de

subtipo de 68%). Os seguintes genótipos e subtipos foram encontrados: genótipo 1, total de quarenta e uma amostras, sendo onze do subtipo 1a, seis do subtipo 1b e vinte e quatro de subtipos indeterminados; dezoito amostras do subtipo 3a e uma amostra 2a, três amostras 2c e treze amostras 2b.

Das oitenta amostras testadas, apenas em quatro não foi possível a obtenção de um sinal específico de hibridização capaz de determinar o genótipo/subtipo presente (TABELA 6).

**TABELA 6. RESULTADOS DA SENSIBILIDADE**

Gen./subtipo	1	1a	1b	2a	2b	2c	3a	indete.
Nº amostras	24	11	6	1	13	3	18	4
Porcentual	51%			21%			23%	5%*

### 5.3.1 Sensibilidade em relação ao genótipo 3; subtipo 3a.

Em relação ao genótipo 3/subtipo 3a (TABELAS 7.e 8), em todas as dezoito amostras em que o genótipo foi determinado também o subtipo foi determinado (18/18, sensibilidade de 100%).

**TABELA 7. AMOSTRAS 3A E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO 5'UTR**

		U11	U2AX	U2AY	U2BX	U2BY	U3A1
3a	br 355	-21,5	-88,5	-62,5	-51,25	-59,25	1548
3a	br 357	-30	-89,5	-78	-82,75	-89,25	728,5
3a	br 360	-38	-110,5	-71,5	-94,25	-82,75	1038,5
3a	br 383	-64,5	-77,5	-78,5	-75,25	-73,25	1110,5
3a	br 384	-68,5	-111	-86,5	-79,75	-86,25	1028,5
3a	br800	-65	-121,5	-120	-104	-57	493,5
3a	br727	-88	-122,5	-128	-99	-75,5	971,5
3a	br807	-67	-103,5	-118	-96	-23,5	585,5
3a	br481	-74	-103,5	-108	-93	-70,5	577,5
3a	br808	62	-96,5	-106	-74	32,5	577,5
3a	br316	-20	-96,5	-107	-60	195	249,5
3a	br825	-29	-92,5	-100	-78	-16	561,5
3a	br91	4	-78,5	-100	-56	63,5	219,5
3a	br206	59,75	-68,5	-56,75	-47,75	-52,75	602,25
3a	2964	-10	-23	3	13	1,5	1182,5
3a	3367	-5	-34,5	-13	-17	-13,5	1046,5
3a	3353	-31	-20	-16	1	-18,5	786,5
3a	3352	-15	-2	-5,5	6	8,5	619,5

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cor.

**TABELA 8. AMOSTRAS 3A E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO NS5B**

	NS1A	NS1BX	NS1BY	NS1C	NS2AX	NS2AY	NS2B	NS2C	NS3AX	NS3AY
3a	-16,5	-26,5	-30,5	-35,5	-43,5	-50,5	-33,5	-22	1522	3877,5
3a	-43,5	-43,5	-39,5	-43,5	-58	-64,5	-51,5	-53	3	-57,5
3a	-52,5	-49	-53	-53	-39,5	-63	-50,5	-65	809,5	2712,5
3a	-50	-44,5	-20,5	-54,5	-40,5	-55	-37,5	-37,5	-49,5	603
3a	-42,5	-52,5	-36,5	-45	-66	-53	-44	-40,5	623	12,5
3a	-76,5	-82,5	-65	-76	-95	-98,5	-85,5	-73,5	423,5	-27,5
3a	-79,5	-82,5	-55	-84	-84	-99,5	-96,5	-78	543,5	-38,5
3a	-66,5	-71,5	-54	-68	-83	-91,5	-80,5	-86,5	-71	-51,5
3a	-64,5	-70	-56	-70,5	-85	-86,5	-90,5	-88	-72,5	-57,5
3a	-69,5	-65,5	-51	-73	-76	-79,5	-81,5	-72,5	-32,5	1245,5
3a	-55,5	-70,5	-49	-68,5	-65	-76,5	-73,5	-81,5	-44,5	-53,5
3a	-39,5	-62,5	-46	-57	-64	-76,5	-70,5	-74,5	-53,5	-12,5
3a	-51,5	-64	-48	-56	-73	-62,5	-66,5	-70,5	-51,5	-46,5
3a	-18,5	-39,75	-207	-52,75	-38,25	-42,25	-42,25	-42	223	13
3a	12,5	6	2	2,5	16,5	2,5	9	21	5,5	1120,5
3a	-21,5	-13	-12	-12	-6	-12	-5	-9	-12,5	-2,5
3a	4	-11	-13	9	1	-8	-8	-3	831,5	51
3a	9	-4	-8,5	11	3	-12,5	-10	-2,5	7,5	-7

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cores.

### 5.3.2 Sensibilidade em relação ao genótipo 2; subtipos 2a, 2b e 2c.

Dezessete amostras foram determinadas pertencerem ao genótipo 2 (TABELAS 9 e 10); destas, uma do genótipo 2a, treze do genótipo 2b e três do genótipo 2c (17/17, sensibilidade de 100%).

**TABELA 9.** AMOSTRAS GEN. 2 E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO 5'UTR

		U11	U2A/CX	U2A/CY	U2BX	U2BY	U3A1
2a	gen 997	-254	550,25	214,25	-9,75	235,25	-113
2b	gen2 1795	-172	-4,75	-11,75	435,25	29,25	-102
2b	gen2 1410	-140	-16,75	-19,75	232,25	43,25	-71
2b	gen2 1859	-322	230,25	1,25	192,25	1020,25	-95
2b	gen2 2663	-192	-20,75	-12,75	359,25	32,25	-30
2b	gen 2a1	-254	-24,75	-25,75	604,25	95,25	-68
2b	gen2390	-215	-29,75	-14,75	530,25	70,25	-68
2b	gen1854	-72	-98,5	-122	381	-58,5	-61,5
2b	gen 2110	-62	-102,5	-100	684	-31,5	-40,5
2b	gen3795	-45	-99,5	-102	250	-50,5	-29,5
2b	gen1752	-51	-98,5	-89	268	-29,5	-18,5
2b	gen3859	77,25	32,5	-45,25	61,25	630,75	15,75
2b	gen3854	56,25	-67	-52,25	455,25	18,75	47,75
2b	3317	-12,5	-15,5	-7	511	54	0,5
2c	gen 2a2	-193	495,25	178,25	-14,75	207,25	-44
2c	gen1896	-60	661,5	-14	-85	32,5	-35,5
2c	gen3896	18,25	537,5	197,75	-46,25	222,25	-12,25

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cores.



**TABELA 10.** AMOSTRAS GEN. 2 E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO NS5B

	NS1A	NS1BX	NS1BY	NS1C	NS2AX	NS2AY	NS2B	NS2C	NS3AX	NS3AY
2a	-18,8	-19	-16,5	-20,5	-9,25	-2,5	-25,5	-0,5	-22	-7,5
2b	-10,8	-24	-10,5	-19,5	-10,25	-13,5	34,5	11,5	-17	12,5
2b	-10,8	-10	-13,5	-9,5	-20,25	-7,5	12,5	4,5	-16	1,5
2b	-15,8	-20	-12,5	-12,5	-16,25	-15,5	343,5	5,5	-17	4,5
2b	-11,8	-9	-8,5	-8,5	-24,25	-22,5	98,5	11,5	-10	3,5
2b	-13,8	-18	-4,5	-3,5	-10,25	-12,5	225,5	62,5	0	-13
2b	-14,8	-6	-15,5	-14,5	-10,25	-18,5	817,5	12,5	-14	1,5
2b	-78,5	-68,5	-47	-72	-67	-88,5	70,5	-78	-76,5	-55
2b	-58,5	-57	-43	-57	-73	-83,5	101,5	-66,5	-61,5	-60
2b	-62,5	-59,5	-50	-64	-68	-76,5	-41,5	-62,5	-52,5	-57
2b	-51,5	-61,5	-50	-60,5	-75	-74,5	-56,5	-65	-65,5	-49
2b	-21,5	-40,8	-64,25	-196	-40,25	-87,5	935,25	-45,5	-53	5
2b	-28	-23,8	-209	18,75	-41,75	58,25	58,25	-43	-61	-6
2b	13	-2	-6	1	1	2,5	2183,5	-4	-4,5	2
2c	-8,75	-15	1,5	-5,5	38,75	36,5	9,5	284,5	7	-5,5
2c	-67,5	-63,5	-44	-60	-69	-75,5	-68,5	684,5	-55,5	-61
2c	-17,5	-12,8	-210	-46,5	-25,25	-33,25	-33,25	1890,5	-53	-15

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cores.

### 5.3.3 Sensibilidade em relação ao genótipo 1; subtipos 1a e 1b.

Das quarenta e uma amostras determinadas serem pertencentes ao genótipo 1 (TABELAS 11,12,13, 14,15 e 16), a determinação do subtipo foi obtida em dezessete amostras, onze do subtipo 1a e seis do subtipo 1b (17/41, sensibilidade de 41%).

**TABELA 11.** AMOSTRAS GEN. 1 E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO 5'UTR

genótipo		U11	U2AX	U2AY	U2BX	U2BY	U3A1
1	br 619	1077,5	-102,5	-78	-99,75	-96,25	-42
1	br 608	1723,5	-78,5	-78	-63,75	-73,75	-47
1	br 575	1204,5	-66	-59,5	-70,25	-62,25	-49,5
1	br 483	1182,5	-107	-74	-51,25	-76,25	-21,5
1	br 180	265,5	-92	-55	-63,25	-65,75	-29,5
1	2729	1265,5	-77	-78,5	-74,25	-65,75	-14
1	br792	246	-125,5	-127	-111	-56,5	-40,5
1	br842	497	-103,5	-122	-103	-36	-39,5
1	br780	278	-116,5	-137	-98	-102,5	-97,5
1	br844	252	-100,5	-107	-94	-35,5	-2,5
1	br606	352	-86,5	-95	-71	-20,5	-25,5
1	br841	457	-86,5	-103	-76	-64,5	-62,5
1	br787	609,25	-89,5	-69,25	-59,75	-69,25	-28,25
1	br766	625,25	-81,5	-66,25	-54,75	-65,75	97,75
1	gen2716	566,75	-79,5	-75,25	-57,75	-74,25	3,75
1	br 603	492,75	-69,5	-51,25	-56,25	-46,75	119,75
1	br564	751,25	-72	-54,25	-50,25	-44,75	53,75
1	br670	740,25	-58,5	-48,25	-47,75	-41,75	130,75
1	br866	668,25	-67,5	-57,25	-47,75	-49,75	45,75
1	br788	250,75	-69,5	-39,25	-49,75	-44,25	-11,25
1	gen2733	621,75	-61	-51,75	-47,75	-46,75	131,75
1	gen2739	804,25	-62	-34,25	-40,25	-40,75	21,75
1	2959	358	-13	-13	-7	-17	-19
1	3355	726	-7	-8	-1	-11,5	-18,5

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cor.

**TABELA 12. AMOSTRAS GEN. 1 E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO NS5B**

gen.	NS1A	NS1BX	NS1BY	NS1C	NS2AX	NS2AY	NS2B	NS2C	NS3AX	NS3AY
1	-64,5	-43	-39	-51	-45	-70	-65	-60,5	-33	-62,5
1	4,5	-44,5	-32,5	-27,5	-34	-52	-36,5	-38,5	-19	-43
1	-41	-34,5	-32,5	-53,5	-41	-48,5	-45	-22,5	20	-55
1	-35	-21,5	-35,5	-36,5	-34	-54,5	-34,5	-23,5	-24,5	-44,5
1	-54	-35,5	-22,5	-49	-38	-53	-43,5	-49	-42	-45,5
1	-26,5	-25,5	-35,5	-60,5	-44	-50	-40,5	-23,5	-32	-43
1	-75,5	39	-63	-79	-83	-95,5	-93,5	-76,5	-71,5	-66,5
1	-70,5	64,5	-59	-69,5	-85	-85,5	-74,5	-85,5	-69	-65,5
1	-67,5	-79,5	-69	-80	-77	-97,5	-87,5	-81	-76,5	-77,5
1	-62,5	-67,5	-52	-62	-89	-75,5	-72,5	-65	-66,5	-66,5
1	-54,5	-50,5	-42	-61	-67	-73,5	-64,5	-68,5	-59	-54,5
1	-49,5	-63,5	-43	-53	-60	-70,5	-63,5	-47,5	-52,5	-50,5
1	-8,5	6,75	-192	-69,3	-59,25	-52,25	-52,25	-46,5	-68	-37
1	-14	-28,75	-187	-65,8	-43,25	-37,25	-37,25	-39	-50	18
1	-9,5	-36,75	-9,5	-74,3	-51,25	-53,25	-53,25	-47,5	-65	5
1	-17,5	-8,75	-218	-46,8	-32,25	-38,25	-38,25	-36,5	-57	8
1	-14,5	-26,25	-231	-44,8	-31,25	-37,25	-37,25	-22,5	-41	15
1	-1,5	-2,75	-215	-41,8	-34,25	-44,25	-44,25	-35,5	-55	42
1	-19,5	-26,75	-211	-49,8	-35,25	-41,25	-41,25	-52,5	-73	-21
1	-22,5	-13,25	-206	-44,3	-31,25	-43,75	-43,75	-35,5	-66	-43
1	-12,5	4,25	-202	-46,8	-26,25	-36,25	-36,25	-34	-37	37,5
1	-6,5	-23,75	-197	-40,8	-14,75	-35,75	-35,75	-39,5	-62	-6
1	9	-6,5	-5	0	-1,5	-18,5	-6	-11	-9,5	-24
1	2	-12	-16	7	-3	-19,5	1	-8,5	-0,5	-18,5

**TABELA 13.** AMOSTRAS 1A E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO 5'UTR

subtipo		U11	U2AX	U2AY	U2BX	U2BY	U3A1
1a	br 562	1347,5	-89,5	-76,5	-53,25	-62,25	-41
1a	br 622	1866,5	-83	-64,5	-59,75	-72,25	-48,5
1a	br 628	2065,5	-59	-52,5	-56,25	-56,25	-47,5
1a	2742	1396,5	-80,5	-63,5	33	-64,75	-32,5
1a	br781	555,75	-70,5	-57,25	-54,75	-49,75	42,75
1a	br2719	645,75	-87	-64,25	-59,75	-60,75	49,75
1a	gen2727	1191,25	11	23,75	24,25	25	2,15
1a	gen2772	867,75	-63	-51,25	-49,75	-54,75	35,75
1a	gen2721	628,75	-74,5	-55,25	-50,75	-36,75	106,75
1a	gen2731	531,25	-63	-51,25	-38,75	-39,75	130,75
1a	3359	501	-4,5	-22	12	-4,5	4,5

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cor.

**TABELA 14.** AMOSTRAS 1A E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO NS5B

sub.	NS1A	NS1BX	NS1BY	NS1C	NS2AX	NS2AY	NS2B	NS2C	NS3AX	NS3AY
1a	900,5	-42,5	-32,5	-44,5	-42	-49	-46,5	-22,5	-18	-55
1a	753,5	-53,5	-27	-49	-55	-56	-44,5	-29,5	-30	-42,5
1a	692,5	-31,5	-21,5	-37,5	-32	-47	-36,5	-25	-39	-36,5
1a	323,5	-44,5	-29	-35	-50,5	-45,5	-45,5	-29,5	-38	-55,5
1a	587,5	45,25	-199	-49,8	-37,25	-36,25	-36,25	-28,5	-44	23
1a	224,5	-21,25	-191	-60,8	-45,25	-52,25	-52,25	-46	-63	17
1a	674,5	-31,25	-69,25	-197	54	-275	-12,25	18	3	1,35
1a	258,5	-1,75	-215	-54,8	-30,25	-40,25	-40,25	-41,5	-62	-6
1a	358,4	-12,75	-209	-36,8	-34,25	-35,25	-35,25	-27,5	-50	-15
1a	605,4	9,75	-54,25	-39,8	-20,75	-33,25	-33,25	-41,5	-37	3
1a	126,5	-1	1	12	14,5	-5,5	-2,5	-7,5	4,5	1

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cor.

**TABELA 15.** AMOSTRAS 1b E VALORES DE NET MFI DAS SONDAS PARA REGIÃO 5'UTR

subtipo		U11	U2AX	U2AY	U2BX	U2BY	U3A1
1b	br 573	1556,5	-89,5	-72,5	-61,25	-72,25	-55
1b	br726	243	-112,5	-128	-103	-74,5	-61,5
1b	br774	403	-120,5	-134	-99	-105,5	-87,5
1b	br759	536,75	-87,5	-64,25	-59,75	-54,75	94,25
1b	br565	746,25	-59,5	-47,75	-29,75	-41,25	49,75
1b	br767	617,25	-70,5	-62,75	-54,75	-56,75	103,75

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cor.

**TABELA 16.**

	NS1A	NS1BX	NS1BY	NS1C	NS2AX	NS2AY	NS2B	NS2C	NS3AX	NS3AY
1b	-46,5	265,5	-32	-45	-53,5	-50	-43,5	-42,5	-37	-50
1b	-66,5	468,5	-62	-73	-81	-90,5	-98,5	-72,5	-79,5	-69,5
							-			
1b	-83,5	295	-57	-87	-96	-91,5	103,5	-75,5	-77,5	-70,5
							-			
1b	-19,5	470,3	-194	-54,8	-43,75	-55,75	55,75	-60	-70	13
							-			
1b	-2,5	364,3	-66,25	-193	-20,25	-25,25	25,25	-26,5	-28	21
							-			
1b	-14,5	312,4	-217	-56,8	-28,25	-47,25	47,25	-27,5	-49	43

Resultados que traduzem sinal específico de hibridização estão ressaltados em cor.

#### 5.4 Especificidade do ensaio de microarranjo líquido.

As amostras submetidas ao teste de microarranjo líquido positivas para a presença de HIV (duas amostras), HAV (duas amostras), HBV (duas amostras), dengue (duas amostras) e uma amostra negativa para a presença de HCV não geraram sinal específico de hibridização, sendo consideradas negativas.



## 5. 5 Avaliação da reprodutibilidade do teste.

A reprodutibilidade do teste foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação (CV) do net MFI de cinco sondas frente às mesmas três amostras. Esta avaliação foi realizada tanto para determinação do CV intra-ensaio, em triplicata, em uma mesma placa; como também para a determinação do CV inter-ensaio, realizada com a avaliação de três amostras em três dias diferentes (TABELAS 17 e 18).

**TABELA 17. COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO netMFI (INTRA-ENSAIO)**

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO INTRA-ENSAIO (TRIPLICATA)					
	U11	U2BX	U3A1	NS1A	NS3AX
coluna 1-4	726	2183,5	1182,5	126,5	831,5
coluna 5-8	927,5	3012	1496,5	137,5	1180
coluna 9-12	1230	3101	2181,5	147	1433,5
média	961,17	2765,50	1620,17	137,00	1148,33
DP	253,68	505,99	510,85	10,26	302,25
CV(%)	26,39	18,30	31,53	7,49	26,32

**TABELA 18. COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO netMFI (INTER-ENSAIO)**

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO INTER-ENSAIO (TRIPLICATA)					
	U11	U2BX	U3A1	NS1A	NS3AX
coluna 1-4	565	178	199	300	535,5
coluna 1-4	600	252	267	456	357
coluna 1-4	408	225	350	480	227
média	524,3333	218,3333	272	412	373,1667
DP	102,26	37,45	75,62	97,73	154,88
CV(%)	19,50	17,15	27,80	23,72	41,51

## **5.6 Avaliação da concordância em relação ao método de sequenciamento/análise filogenética da região NS5b.**

Cinquenta e sete amostras que haviam sido previamente sequenciadas em sua região NS5b e analisadas filogeneticamente para a determinação do genótipo e subtipo do HCV foram testadas pelo teste microarranjo líquido. Destas, em apenas duas amostras não se obtiveram sinais indicadores de hibridização específica capazes de ao menos determinarem o genótipo; uma dessas amostras era do genótipo/subtipo 2b e a outra do 3a, conforme a determinação realizada pelo método de sequenciamento; ou seja em 96% das amostras a determinação foi possível (55/57). As demais amostras apresentaram os seguintes resultados: treze amostra

do genótipo 2, sendo uma do subtipo 2a, nove do subtipo 2b e três do subtipo 2c, as quais concordaram totalmente com os resultados de sequenciamento (13/13, 100%); em relação ao genótipo/subtipo 3a, das onze amostras em que se obteve sinal específico, em todos os casos houve concordância (11/11, 100%); e na avaliação das trinta e uma amostras do genótipo 1, sendo quinze do subtipo 1a e dezesseis do subtipo 1b, o microarranjo foi capaz de determinar o genótipo em todas as amostras (31/31, 100%) e o subtipo em quatorze das trinta e uma amostras nas quais o sequenciamento atribuiu um subtipo (14/31, sensibilidade na determinação de subtipo dentro do genótipo 1 de 45%, coeficiente de correlação de kappa 0,56). Sendo que em oito amostras do subtipo 1a (8/15, sensibilidade na determinação do subtipo 1a de 53%, coeficiente de correlação de kappa 0,32) e seis amostras do subtipo 1b (6/16, sensibilidade na determinação do subtipo 1b de 38%, coeficiente de correlação de kappa 0,12) (TABELA 19).

**TABELA 19. CONCORDÂNCIA EM RELAÇÃO AO SEQUENCIAMENTO**

Gen./subtipo	1	1a	1b	2a	2b	2c	3a	indete.
SEQUEN.			15	16	1	10	3	12
MICROA.	17		8	6	1	9	3	11
								2

### **5.7.Avaliação da concordância em relação ao método comercial Versant HCV genotype 1.0.**

A avaliação da concordância em relação ao método comercial Versant HCV genotype 1.0 foi realizada, tendo o método de sequenciamento/análise filogenética da região NS5b como teste de referência na resolução de amostras discordantes. Setenta e oito amostras previamente testadas pelo método Versant HCV genotype 1.0 foram testadas pelo ensaio de microarranjo. Destas, quatro amostras não apresentaram sinal específico de hibridização (uma amostra de cada um dos genótipos/subtipos: 1a, 1b, 2 e 3a). A sensibilidade do microarranjo líquido em relação às amostras previamente testadas foi de 95% (74/78). A concordância em relação à determinação do genótipo foi completa (74/74, 100%). Em relação aos subtipos, nas dezessete amostras 3 a pelo Versant HCV genotype 1.0 houve concordância completa com a determinação realizada pelo microarranjo (17/17, 100%); Em sete amostras determinadas como 2b pelo Versant HCV genotype 1.0, houve total concordância com o teste de microarranjo (7/7, 100%), não houve determinação de nenhuma amostra como subtipos 2 a ou 2c pelo Versant HCV genotype 1.0, contudo uma amostra foi determinada como 2 a pelo microarranjo (confirmado pelo sequenciamento) e apenas como genótipo 2 pelo Versant HCV genotype 1.0. Outras duas amostras foram determinadas como 2c pelo microarranjo (confirmado pelo sequenciamento) e novamente apenas como genótipo 2 pelo Versant HCV genotype 1.0. Em relação aos subtipos do genótipo 1, de oito amostras determinadas como 1 a pelo Versant HCV genotype 1.0, houve concordância com o microarranjo em três (3/8, coeficiente de correlação de kappa 0,18), sendo que não

havia sequenciamento em duas, destas cinco amostras discordantes. Em vinte e uma amostras determinadas como subtipo 1b pelo Versant HCV genotype 1.0, houve concordância com o microarranjo em seis amostras (6/21, coeficiente de correlação de kappa 0,07), sendo que não havia sequenciamento em quatro das amostras discordantes. Ainda em relação aos subtipos do genótipo 1, em treze amostras que o Versant HCV genotype 1.0 não foi capaz de atribuir um subtipo, o teste de microarranjo o fez em sete amostras, todas do subtipo 1a (confirmadas por sequenciamento), ou seja, em 54% (7/13, coeficiente de correlação de kappa 0,33) (TABELA 20).

**TABELA 20. CONCORDÂNCIA EM RELAÇÃO AO VERSANT HCV GENOTYPE 1.0**

Gen./subtipo	1	1a	1b	2	2a	2b	2c	3a	indete.
VERSANT	21	8	21	4			7	17	
MICROA.	32	7	8			1	7	2	17

---

### **5.8 Avaliação da concordância em relação ao método RT-PCR em tempo-real *in house*.**

Setenta e uma amostras que tiveram seus genótipos/subtipos determinados pelo método RT-PCR em tempo-real “in house” foram posteriormente testadas pelo ensaio de microarranjo. Os casos discrepantes foram resolvidos pela determinação encontrada pelo método de sequenciamento/análise filogenética. Com exceção de duas amostra onde nenhum sinal específico de hibridização foi obtido, houve

concordância em relação a determinação do genótipo em todos os casos restantes (69/69, 100%). Também foi observado que para duas amostras (uma 2a e outra 2c, determinadas através de sequenciamento) não foi possível a determinação de seus genótipos/subtipos pelo método de RT-PCR em tempo-real, no entanto, estas duas amostras tiveram os genótipos e subtipos corretamente atribuídos pelo microarranjo. Das dezenove amostras determinadas como 1a pelo método de RT-PCR em tempo-real, dez amostras apresentaram o mesmo resultado pelo microarranjo (10/19, sensibilidade para determinação do subtipo 1a de 53%, coeficiente de correlação de kappa 0,56); em relação ao subtipo 1b, de vinte e uma amostras pelo método de RT-PCR em tempo-real, seis mostraram concordância ao ensaio de microarranjo (6/21, sensibilidade para determinação do subtipo 1b de 29%). Uma única amostra do subtipo 2a foi determinada pelos dois métodos; uma amostra de 2c foi igualmente confirmada pelo microarranjo e de treze amostras do subtipo 2b ao tempo-real, 11 mostraram concordância ao microarranjo (11/13, coeficiente de correlação de kappa 0,88). Todas as quatorze amostras de subtipo 3a foram igualmente determinadas pelos dois métodos (14/14, 100% de sensibilidade) (TABELA 21).

**TABELA 21. CONCORDÂNCIA EM RELAÇÃO AO *IN HOUSE* TEMPO-REAL**

Gen./subtipo	1	1a	1b	2a	2b	2c	3a	indete.	
TEMPO- REAL			19	21		13	2	14	2
MICROA.	24		10	6	1	11	3	14	2

## 6. DISCUSSÃO

A alta prevalência mundial da infecção pelo HCV e sua tradução em elevada morbidade e mortalidade tem conferido a esta afecção o *status* de problema de saúde pública . Além do impacto na saúde de milhões de indivíduos e nas vidas de suas famílias, os custos sociais diretos e indiretos são muitíssimo elevados . A partir da descoberta da existência do vírus da hepatite C (HCV) em 1989,(CHOO *et al.*, 1989), foi possível o desenvolvimento de testes imunológicos e de detecção de ácido nucléico que permitiram subseqüentes avaliações da magnitude de sua distribuição em diferentes áreas geográficas e grupos populacionais. Uma vez constatada a grande variabilidade gênica do HCV e subseqüente classificação surgiram inúmeros estudos buscando uma correlação que associa-se os diferentes genótipos a manifestações clínicas específicas .

Após o início da utilização do interferon no tratamento da infecção crônica pelo HCV, foram observadas diferentes respostas a este conforme o genótipo envolvido . Hoje sendo consenso o tratamento para o genótipo 1 pelo dobro do tempo dos genótipos 2 e 3, e ainda com menor taxa de resposta . Uma vez estabelecida a relevância da determinação genotípica no tratamento e prognóstico da infecção pelo HCV, a demanda por testes laboratoriais para este fim foi imediata e em grande escala .

Inúmeros testes têm sido desenvolvidos com esta finalidade e alguns são comercializados difusamente . Como característica comum dos testes comercializados pode-se citar: ótima sensibilidade na determinação do genótipo, limitações na determinação dos subtipos, necessidade de profissionais altamente qualificados para sua realização e custos muito elevados. Na busca do

desenvolvimento de testes sensíveis, específicos, de alto rendimento e menor custo, várias tecnologias tem sido sucessivamente utilizadas para criação de ensaios para determinação de genótipo/subtipo do HCV . O objetivo do presente trabalho vai de encontro a realidade encontrada, tornando-o ainda mais relevante quando situado em um contexto propício, ou seja, o interesse no desenvolvimento tecnológico do Brasil na área de pesquisa e desenvolvimento de produtos para diagnóstico laboratorial e a necessidade de diminuir os gastos associados à importação de *kits* diagnósticos.

Não há relato de nenhum teste, para a determinação do genótipo/subtipo do HCV, que utilize duas regiões do genoma viral em seu método. A escolha da metodologia de microarranjo atende aos objetivos deste trabalho uma vez que uma vez feita a escolha de se analisar simultaneamente duas regiões genômicas e sendo necessária a presença de pelo menos uma sonda específica para cada genótipo/subtipo (1a,1b,2a, 2b,2c e 3a), a base tecnológica utilizada deveria possibilitar a utilização de pelo menos doze sondas (seis para cada região). Além disso, como existem ainda os genótipos 4, 5 e 6; seria desejável que a adaptação futura para abrangência destes genótipos com seus respectivos subtipos não fosse impedida devido a limitações do formato da plataforma onde o teste inicial foi desenvolvido.

A base deste teste de microarranjo encontra-se em uma reação de transcrição reversa seguida de uma PCR. Das oitenta amostras positivas para a presença do HCV houve amplificação da região 5'UTR em setenta e seis amostras e das regiões 5'UTR e NS5b conjuntamente em trinta e nove amostras. Em nenhuma das amostra houve amplificação apenas da região NS5b. Correlacionando com o resultado obtido



no microarranjo líquido, observou-se sinal de hibridização específica referente às duas regiões em todas as amostras onde houve amplificação das duas regiões à PCR; com exceção de duas amostras onde houve amplificação das duas regiões e apenas sinal específico proveniente da hibridização referente às sondas 5'UTR. A baixa eficiência na amplificação simultânea das duas regiões genômicas (39/80, 49%) foi responsável pela incapacidade do teste em determinar o subtipo em pelo menos vinte duas amostra das setenta e seis em que o genótipo foi determinado com sucesso. E esta incapacidade só não foi maior devido ao fato que somente em relação aos subtipos 1a e 1b a amplificação da região NS5b é necessária para determinação do subtipo; em relação aos subtipos 2a,2b,2c e 3a a amplificação da região 5'UTR é suficiente. Nos dois casos onde houve amplificação das duas regiões à PCR sem tradução em sinal específico de hibridização a sondas das duas regiões, a razão para tanto permanece elusiva. É possível que a formação de alguma estrutura secundária específicas destes produtos de amplificação tenha impedido a efetiva hibridização às sondas de captura ou algum produto de PCR espúrio, contendo o primer biotilado, tenha se formado em detrimento do produto de PCR que conteria a fita específica para a hibridização (ainda que nenhuma outra banda tenha sido observada no gel de eletroforese). Faz-se necessária a otimização da PCR multiplex para a solução deste fator limitante. Uma alternativa seria a otimização das reações de PCR em separado, porém isto não seria desejável, uma vez que isto aumentaria o tempo de realização do ensaio e diminuiria seu rendimento.

Em relação ao resultado das reações de confirmação de ligação às microesferas (acoplamento), através da hibridização dos oligonucleotídeos

sintéticos, observou-se sinal específico de hibridização em relação às dezesseis sondas testadas; o menor MFI obtido foi de 11897 pela sonda NS2B o que indica hibridização adequada. Os resultados encontrados em relação à sensibilidade do método para a determinação do genótipo do HCV foram considerados adequados à finalidade do teste (95%). Já a determinação dos subtipos foi considerada aquém do esperado (52/76, sensibilidade para determinação de subtipo de 68%). A maior parte das amostras onde não foi possível a determinação genotípica ou subtípica, isto provavelmente ocorreu devido a ineficiência da reação de RT-PCR. Note-se ainda que em dois casos, apesar da presença de uma banda considerada específica para a amplificação da região NS5B no gel de eletroforese, não houve sinal específico em nenhuma das sonda para esta região. Mesmo tendo-se conseguido amplificação da região NS5b em apenas trinta e nove das oitenta amostras tentadas (39/80, 49%), foi possível a determinação do subtipo em um maior número de vezes (52/76, sensibilidade para determinação de subtipo de 68%). Isto se deu pelo fato de que apesar da região NS5b ser mais informativa em relação a variabilidade a nível de subtipo em todos os genótipos— é a região de escolha para sequenciamento— a região 5'UTR é informativa o suficiente para resolução subtípica dos genótipos 2 e 3. O mesmo não se deu em relação ao genótipo 1. Apenas dezessete em quarenta e uma amostras tiveram seus subtipos determinados (17/41, 41%). Neste genótipo a região 5'UTR, a mais conservada do genoma do HCV, não apresenta variabilidade de forma consistente a permitir a diferenciação dos diferentes subtipos. Publicações anteriores têm salientado este fato (CHEN *et al.*, 2002). e baseado nisto o desenho do presente ensaio inclui a amplificação da região NS5b. Estas considerações são realizadas com o intuito de explicar por que foi possível determinar o subtipo em

todos as amostras dos genótipos 2 e 3, e por que isto ocorreu em menos da metade das amostras do genótipo 1.

Parece haver necessidade, na futura otimização deste teste de microarranjo, da inclusão de um calibrador interno presente já na amostra a ser testada. Este calibrador deveria conter um alvo molecular que gerasse um produto de PCR de tal extensão que permita sua diferenciação dos produtos provenientes das amplificações das regiões 5'UTR e NS5b. Além disso haveria necessidade de uma sonda específica, no microarranjo, para hibridização deste produto. Desta forma seria possível identificar qual fase do ensaio foi ineficiente.

A avaliação da especificidade do ensaio foi realizada com amostras positivas para a presença de HIV, HBV, HAV e dengue. Em relação ao vírus da dengue sua escolha se deu por apresentar algumas características similares ao HCV (ambos pertencem à família flaviviridae). Em relação ao HBV e HAV, ambos são causadores de hepatite e suas presenças são testadas em virtualmente todos os pacientes avaliados laboratorialmente para hepatite C. Além disso a co-infecção HBV/HCV é considerada elevada . Neste mesmo aspecto foi decidido pela avaliação da especificidade do teste em relação ao HIV, onde a presença de fatores de riscos similares e conseqüente co-infecção HIV/HCV têm sido bem estabelecida. Em que pese o número restrito de amostras testada (oito amostras), em nenhuma amostra houve sinal específico de hibridização proveniente de qualquer das sondas. Este aspecto favorável do teste precisa ser reavaliado em um número ampliado de amostras e eventualmente de patógenos adicionais para sua confirmação.

Os resultados obtidos em relação à reprodutibilidade do método demonstram a consistência do ensaio, uma vez que não houve nenhum caso de discrepância de

determinação de genótipo ou subtipo, seja na avaliação de replicatas intra-ensaio ou inter-ensaio. Contudo, é digno de nota o aumento da intensidade de fluorescência (MFI) à medida que aumenta o tempo de exposição à estreptoavidina-ficoeritrina (avaliação intra-ensaio). O grupo de replicatas das últimas colunas, de uma placa convencional de ELISA que é utilizada na leitura do teste pelo sistema Luminex, apresenta uma média de MFI superior ao grupo situado na porção intermediária da placa o qual por sua vez é maior que a média do grupo situado nas primeiras colunas. Estes achados não tiveram repercussão nos resultados/finalidade do presente ensaio, porém é possível que venham a ser relevantes em outros ensaios baseados em microarranjo líquido. Isto se torna mais claro quando lembrado que o tempo de reação envolvendo ligação com estreptoavidina-ficoeritrina no presente ensaio é de cinco minutos. Eventualmente um outro tipo de ensaio em que a relação sinal-ruído não fosse tão adequada como no presente teste, o aumento do tempo de exposição à estreptoavidina-ficoeritrina pudesse ser um fator de otimização.

Uma vez que o sequenciamento/análise filogenética é padrão ouro na determinação do genótipo/subtipo do HCV, os resultados ao teste de microarranjo de cinquenta e cinco amostras foram comparados com os obtidos por sequenciamento/análise filogenética.

Os resultados encontrados: alta sensibilidade na determinação do genótipo, concordância total em relação a determinação do genótipo e baixa sensibilidade na determinação do subtipo, ainda que com alta concordância; foram similares aos encontrados por outros métodos. Nolte *et al.*, 2003, avaliaram os dois testes mais comercializados para determinação do genótipo do HCV (Versant e Trugene) em relação ao sequenciamento/análise filogenética. Ambos foram capazes de

determinar os subtipos em mais de 99%, no entanto não determinaram o subtipo em 16,5% (Versant) e 17,1% (Trugene). Kleter *et al.*, 1995 em avaliação do Versant HCV genotype 1.0 e de um método baseado em amplificação da região “core” primer específica, igualmente concluíram da efetividade dos mesmos na determinação do genótipo e da limitação em relação a determinação de subtipo.

Não há nenhuma publicação, do conhecimento do autor, que tenha relatado o uso da tecnologia de microarranlo líquido, na determinação do genótipo do HCV. Não havendo como comparar os resultados obtidos no presente estudo com outro que tenha usado a mesma base tecnológica.

Na comparação com o método Versant HCV genotype 1.0, avaliando setenta e oito amostras, novamente houve excelente correlação na determinação dos genótipos. Em relação a determinação dos subtipos a sensibilidade de ambos foi baixa bem como a concordância dos métodos entre si. No estudo já acima citado (NOLTE *et al.*, 2003), a discordância na determinação de subtipos entre os dois diferentes métodos foi de 14,2%.

Na avaliação frente as setenta e uma amostras testadas por ambos, microarranjo e RT-PCR “in house”, novamente houve concordância total em relação à determinação do genótipo. No entanto aqui ficou evidente a superioridade do método RT-PCR “in house” na determinação dos subtipos, principalmente em relação aos subtipos pertencentes ao genótipo 1. Isto se deve a alta eficiência na amplificação da região NS5b, ainda que para tanto seja necessária a realização de duas reações de PCR separadas: uma para a amplificação dos genótipos 1 e 3 e outra para a amplificação do genótipo 2; diferindo principalmente nos parâmetros de termociclagem.

A conclusão de um estudo realizado por Seme *et al.*, 1997, onde quatro métodos são comparados: 1) amplificação da região “core” com primer genótipo-específicos, 2) “nested” PCR seguida com hibridização com sondas específicas, 3) Versant HCV genotype 1.0 e 4) análise de polimorfismo de extensão de fragmento de restrição, foi de que todos os métodos foram capazes de determinar os diferentes genótipos, porém todos igualmente apresentaram limitações em relação a determinação dos subtipos .

Conclui-se daí que o ensaio desenvolvido no presente trabalho se comportou de maneira análoga aos testes acima descritos. Isto ocorreu porque embora seu desenho contemplasse duas regiões genômicas, só houve amplificação consistente da região 5'UTR. E neste aspecto os testes mais recentes, baseados em RT-PCR em tempo-real que têm a região NS5b eficientemente amplificada, são superiores na determinação do subtipo (ROLFE *et al.*, 2005 ; NAKATANI *et al.*, 2008 e MARTRO *et al.*, 2008).

Contudo, o que atualmente tem relevância clínica é a determinação do genótipo envolvido na infecção e não a determinação do subtipo. Neste aspecto o método do presente trabalho mostrou-se eficiente. Além disso não há relato, pelo menos do conhecimento do autor, de um método que avalie simultaneamente as regiões 5'UTR e NS5b na determinação de genótipo e subtipo do HCV. Este método, devido a esta característica, poderia diagnosticar casos de recombinação inter-genotípica, os quais têm sido descritos. Neste caso haveria discrepância entre os resultados encontrados referentes às duas regiões. Inclusive determinar o genótipo em relação à região genômica que especificamente tem relevância na estratégia de tratamento .

Observada a grande sobreposição dos testes existentes na eficiência da determinação do genótipo, a metodologia que apresente o menor custo, menor tempo de execução e maior rendimento, possui a maior probabilidade de ser mais amplamente adotada.

## 7. CONCLUSÕES

As maiores vantagens dos testes baseados em microarranjo líquido são: 1) a capacidade potencial de realizar cem reações, na plataforma utilizada no presente trabalho, simultaneamente e a partir de uma única amostra de plasma, 2) a flexibilidade com que novos alvos moleculares são adicionados ou removidos de determinado ensaio conforme o contexto epidemiológico em que será utilizado e 3) a gradativa melhora da relação custo-benefício à medida que aumenta o número de alvos moleculares a serem detectados (diferentes patógenos, subtipos e polimorfismos).

Todas estas vantagens são altamente desejáveis na escolha de um método para a determinação de genótipo e subtipo do HCV. Em que pese este ensaio contemplar apenas três genótipos, por razões epidemiológicas já consideradas, sua expansão seria desejada para que eventualmente pudesse ser exportado. Neste aspecto a tecnologia de microarranjo facilmente permitiria a inclusão de mais sondas de captura com esta finalidade. Em comparação com a tecnologia de RT-PCR em tempo-real, a limitação do número de sondas permitiria a expansão do teste somente às custas de um aumento no número de reações de amplificação e detecção paralelas. Isto lhe seria uma considerável desvantagem ao aumentar consideravelmente o custo e diminuir o rendimento.

A otimização futura da fase de amplificação dos alvos moleculares, deve tornar o microarranjo líquido um dos métodos de escolha na determinação do genótipo e subtipo do vírus da hepatite C.



## REFERÊNCIAS.

- Alter, M.J.; Margolis HS, Krawczynski K, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. **N Engl J Med** 1992; 327:1899-905.
- Ansaldi, F., F. Torre, B. M. Bruzzone, A. Picciotto, P. Crovri, and G. Icardi. 2001. Evaluation of a new hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. **J. Med. Virol.** 63:17-21
- Armstrong B, Stewart M, Mazumder A. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. **Cytometry.** 2000 Jun 1;40(2):102-8.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol** 1990;28(3):495-503.
- Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jan;38(1):41-9. Epub 2005 Jan 18. Erratum in: **Braz J Med Biol Res.** 2006 Mar;39(3):419
- Chen Z and. Weck K E. Hepatitis C Virus Genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region Cannot Accurately Distinguish Genotypes 1a and 1b **J. Clin. Microbiol.** 2002 40: 3127-3134.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. **Science** 244, 359–362.
- Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C; Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. **J Viral Hepat.** 2001 Mar;8(2):87-95.
- Cook L, Sullivan K, Krantz EM, Bagabag A, Jerome KR. Multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for determination of hepatitis C virus genotypes. **J Clin Microbiol** 2006;44(11):4149-56.

Diaz Mara R. and Jack W. Fell. High-Throughput Detection of Pathogenic Yeasts of the Genus *Trichosporon* . **Journal of Clinical Microbiology**, August 2004, p. 3696-3706, Vol. 42, No. 8.

Drexler JF, Kupfer B, Petersen N, Grotto RM, Rodrigues SM, Grywna K, Panning M, Annan A, Silva GF, Douglas J, Koay S. C., Smuts H, Netto EM, Simmonds P, Pardini MI, Roth WK, Drosten C. A Novel Diagnostic Target in the Hepatitis C. Virus Genome. **PLoS Med.** February 2009, Volume 6, Issue 2 e1000031.

Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, Jacobson JW. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. **J Microbiol Methods.** 2003 May;53(2):245-52.

Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. **Clin Chim Acta.** 2006 Jan;363(1-2):71-82.

Fabrizi f. ; Martin p. ; Quan s. ; Dixit v. ; Brezina m. ; Conrad a. ; Polito a. ; Gitnick g. ; **American journal of kidney diseases** 2000, vol. 35, n<sup>o</sup>5, pp. 832-838.

Flint, M., Quinn, E. R., Levy S. In search of hepatitis C virus receptor(s). **Clin Liver Dis** 2001;5: 873-93.

Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, and Kettman JR.1 Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix<sup>TM</sup> system. **Clinical Chemistry** 43:9 1749–1756 (1997)

Garson JA, Ring C, Tuke P, Tedder RS. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. **Lancet.** 1990 Oct 6;336(8719):878-9.

Germer JJ, Zein NN. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. **Mayo Clin Proc.** 2001 Sep; 76(9):911-20.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Res.** 1996 Oct;6(10):995-1001.

Gotoh, M : Hasegawa, Y : Shinohara, Y : Shimizu, M : Tosu, M . A new approach to determine the effect of mismatches on kinetic parameters in DNA hybridization using an optical biosensor. **DNA-Res.** 1995 Dec 31; 2(6): 285-93.

Halfon, P., P. Trimoulet, M. Bourliere, H. Khiri, V. de Le´dinghen, P. Couzigou, J. M. Feryn, P. Alcaraz, C. Renou, H. J. A. Fleury, and D. Ouzan. 2001. Hepatitis C virus genotyping based on 5\_ noncoding sequence analysis (Trugene). **J. Clin. Microbiol.** 39:1771–1773.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR.

**Genome Res.** 1996 Oct; 6(10):986-94

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology** (N Y). 1993 Sep;11(9):1026-30

Horan PK, Wheelless LL. Quantitative single cell analysis and sorting. **Science** 1977;198:149–57.

Ikeda K, Saitoh S, Koida I, et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. **Hepatology** 1993;18:47-53. 20.

Ikuta S, K Takagi, R B Wallace, and K Itakura Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs. **Nucleic Acids Res.** 1987 January 26; 15(2): 797–811.

Ilin E N,<sup>1\*</sup> Maja V. Malakhova, Edward . Genozov, Eugene N. Nikolaev, and Vadim M. Govorun. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (Mass Spectrometry) for Hepatitis C Virus Genotyping. **Journal of Clinical microbiology**, June 2005, p. 2810–2815

Jacobs K A, Rudersdorf, S D Neill, J P Dougherty, E L Brown, and E F Fritsch. The thermal stability of oligonucleotide duplexes is sequence independent in tetraalkylammonium salt solutions: application to identifying recombinant DNA clones. **Nucleic Acids Res.** 1988 May 25; 16(10): 4637–4650

Jeffrey J. Germer,<sup>1</sup> David W. Majewski,<sup>1</sup> Michael Rosser,<sup>2</sup> Amber Thompson,<sup>2</sup> P. Shawn Mitchell,<sup>1</sup> Thomas F. Smith,<sup>1</sup> Slava Elagin,<sup>2</sup> and Joseph D.C. Yao<sup>1\*</sup> Evaluation of the TRUGENE HCV 5'NC Genotyping Kit with the New GeneLibrarian Module 3.1.2 for Genotyping of Hepatitis C Virus from Clinical Specimens. **J Clin Microbiol.** 2003 October; 41(10): 4855–4857.

Kleiber J, Walter T, Haberhausen G, Tsang S, Babel R, Rosenstraus M. Performance characteristics of a quantitative, homogeneous TaqMan RT-PCR test for HCV RNA. **J Mol Diagn** 2000;2:158–66.

Kleter G. E. M. 1, L. J. van Doorn , L. Stuyver , G. Maertens , J. T. Brouwer , S. W. Schalm , R. A. Heijntink 1, W. G. V. Quint . Rapid genotyping of hepatitis C virus RNA-isolates obtained from patients residing in Western Europe. **Journal of Medical Virology** .Volume 47 Issue 1, Pages 35 – 42.

Kobayashi M, Chayama K, Arase Y, Tsubota A, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Ikeda K, Matsuda M, Koike H, Hashimoto M, Kumada H., Enzyme-linked immunosorbent assay to detect hepatitis C virus serological groups 1 to 6. **J Gastroenterol.** 1999 Aug;34(4):505-9.

Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Sodoyer M, Chevallier P, Mandrand

B, Lotteau V, et al. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. **J Virol Methods** 2001;95:111–9.

Focaccia R, da Conceição OJ, Sette Jr H et al. (1998). Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2: 269-284.

Livshits M.A., Mirzabekov A.D.. Theoretical analysis of the kinetics of DNA hybridization with gel-immobilized oligonucleotides. **Biophysical Journal** 1996 71(5) pp. 2795 – 2801.

Maskos U and Southern E M.. Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation. **Nucleic Acids Research**, 1992, Vol. 20, No. 7 1675-1678

Maskos U and Southern E M.A study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesised on a glass support. **Nucleic Acids Res.** 1993 October 11; 21(20): 4663–4669

Martró E, González V, Buckton AJ, Saludes V, Fernández G, Matas L, Planas R, Ausina V. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. **J Clin Microbiol.** 2008 Jan;46(1):192-7.

Nakao, T., N. Enomoto, N. Takada, A. Takada, and T. Date. 1991. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. **J. Gen. Virol.** 72:2105–2112

Nakatani SM. Genotipagem do vírus da Hepatite C por PCR em tempo real com base na análise da região NS5B. **Tese de doutoramento. USP.**2008.

Neumann, A. U. et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. **Science** 282, 103–107 (1998).

Nolte FS,. Green AM,1Kristin R. Fiebelkorn, Angela M. Caliendo,Cynthia Sturchio, Aileen Grunwald,and Mimi Healy.Clinical Evaluation of Two Methods for Genotyping Hepatitis C Virus.Based on Analysis of the 5\_ Noncoding Region. **Journal of Clinical Microbiology**, Apr. 2003, p. 1558–1564 Vol. 41, No. 4.

Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. **N Engl J Med** 1994;330:744-50

Okamoto, H., Kojima, M., Okada, S. & 7 other authors (1992). Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. **Virology** 190, 894–899.

Radziewicz H NF. Genotyping of hepatitis C virus (HCV) using a real time polymerase chain reaction (PCR) assay. **J. Mol. Diagn.** 2004;6(4):425.

Rice, C. M. e Lindenbach, B.D. 2005.Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature.** 436, 933-938.

Rolfe KJ, Alexander GJ, Wreghitt TG, Parmar S, Jalal H, Curran MD. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping. : **J Clin Virol.** 2005 Oct;34(2):115-21.

Sarrazin C, Teuber G, Kokka R, Rabenau H, Zeuzem S. Detection of residual hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction-based assays. **Hepatology.** 2000 Oct; 32 (4 Pt 1):818-23.

Seme K; Poljak M; Dovc P; Koren S. Comparative evaluation of four genotyping methods for hepatitis C virus. **Folia biologica** 1997;43(6):219-24.

Simmonds, D. B. Smith, F. McOmish, P. L. Yap, J. Kolberg, M. S. Urdea, and E. C. Holmes Identification of Genotypes of Hepatitis C Virus by Sequence Comparisons in the Core,E and NS-5 Regions. **J. Gen. Virol.**, May 1994; 75: 1053 - 1061..

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on.**Journal of General Virology** (2004), 85, 3173–3188.

Smith, D. B., Pathirana, S., Davidson, F., Lawlor, E., Power, J.,Yap, P. L. & Simmonds, P. (1997). The origin of hepatitis C virus genotypes. **J Gen Virol** 78, 321–328.

Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. **Gastroenterology.** 1999 Mar; 116(3):636-42.

Tanaka T, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Yagi S, Tanaka S, Hasegawa A, Ohta Y, Hattori N, Kohara M., .Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virus. **Hepatology.** 1994 Jun;19(6):1347-53.

Thompson WD, Walter SD. Kappa and the concept of independent errors. **J Clin Epidemiol** 1988;41(10):969-70.

Timm J, Roggendorf M. Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. 1: **World J Gastroenterol.** 2007 Sep 28;13(36):4808-17.

Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, Celis L, Huyck E, Wollants E, Morimoto J, Farrior A, Sablon E, Jankowski-Hennig M, Schaper C, Johnson P, Van Ranst M, Van Brussel M. Evaluation of Versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0. **J Clin Microbiol.** 2008 Jun;46(6):1901-6.

Weck K. Molecular methods of hepatitis C genotyping. **Expert Rev Mol Diagn** 2005;5(4):507-20.

Wetmur JG. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. 1991;26(3-4):227-59.

Wood W I, Gitschier J, L A Lasky, and R M Lawn .Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1985 March; 82(6): 1585–1588.

Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet**. 1993 Mar 20;341(8847):722-4.

Zein NN, Germer JJ, Wendt NK, Schimek CM, Thorvilson JN, Mitchell PS, Persing DH. Indeterminate results of the second-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay: significance of high-level c22-3 reactivity and influence of HCV genotypes. **J Clin Microbiol**. 1997 Jan;35(1):311-2.

Zignego AL, Brechot C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. **J Hepatol** 1999;31:369-76.